

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd



**STUDIUM VLIVU ALBENDAZOLU V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ NA
ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM JETELE LUČNÍHO (*TRIFOLIUM PRATENSE*)**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Bc. Mikešková Gabriela

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 2021

Bc. Mikešková Gabriela

Na tomto místě bych ráda poděkovala paní prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při řešení diplomové práce. Dále děkuji za umožnění práce v laboratořích Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

Poděkování také patří Mgr. Martině Navrátilové, za poskytnutí materiálů pro praktickou část diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem mým nejbližším, kteří mě při studiu podporovali.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Mikešková Gabriela

Školitel: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium vlivu albendazolu v životním prostředí na
antioxidační systém jetele lučního (*Trifolium pratense*)

V dnešní době patří anthelmintika mezi nezbytná léčiva k terapii a profylaxi infekčních onemocnění způsobených parazitickými červy. Nicméně tyto látky mohou být dále vylučovány do životního prostředí exkrementy ošetřených zvířat a ovlivňovat necílové organismy, jako jsou rostliny, které mají schopnost absorpce a akumulace látek.

V této studii jsme se zaměřili na působení často používaného anthelmintika albendazolu na antioxidační systém jetele lučního (*Trifolium pratense*), který se běžně vyskytuje na loukách a pastvinách. Byl sledován vliv nízkých koncentrací albendazolu, dosažitelných v životním prostředí na antioxidační enzymy katalázu, superoxiddismutázu, askorbátperoxidázu, peroxidázu, glutathionperoxidázu, glutathionreduktázu a glutathion-S-transferázu. Kromě antioxidačních enzymů jsme sledovali i koncentraci rostlinných fotosyntetických pigmentů chlorofyl *a*, *b* a karotenoidů. Vyhodnocení výsledků proběhlo u kontrolních i albendazolem ovlivněných rostlin jetele vypěstovaných na experimentálním poli ve zcela přirozených podmínkách. U všech zmíněných enzymů byla zaznamenána změna specifické aktivity, kromě enzymů glutathionreduktázy a glutathionperoxidázy, kde nebyla naměřena žádná aktivita. U rostlinných pigmentů došlo pouze k zvýšení koncentrace karotenoidů. Vzhledem k dosaženým výsledkům, které ukázaly signifikantní změny specifické aktivity u některých enzymů a změnu koncentrace u karotenoidů, nemůžeme vyloučit vliv albendazolu jako stresoru na antioxidační systémy jetele lučního.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Gabriela Mikešková

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of the effect of albendazole in the environment on
the antioxidant system of red clover (*Trifolium pratense*)

Today, anthelmintics are among the essential drugs for the therapy and prophylaxis of infectious diseases caused by parasitic worms. However, these substances may be further released into the environment by the excrements of treated animals and affect non-target organisms, such as plants, which have the ability to absorb and accumulate various substances.

In this study, we focused on the effect of the often used anthelmintic albendazole on the antioxidant system of red clover (*Trifolium pratense*), which is commonly found in meadows and pastures. The effect of low concentrations of albendazole available in the environment on the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, peroxidase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase was studied. In addition to antioxidant enzymes, we also monitored the concentration of plant photosynthetic pigments chlorophyll a, b and carotenoids. The results were evaluated in control and albendazole-treated clover plants grown in the experimental field under completely natural conditions. A change in specific activity was found for all mentioned enzymes, except for the glutathione reductase and glutathione peroxidase, where no activity was measured. In the case of plant pigments, there was only an increase in the concentration of carotenoids. Given the results obtained, which showed significant changes in the specific activity of some enzymes and a change in the concentration of carotenoids, we cannot rule out the effect of albendazole as a stressor on the antioxidant systems of red clover.

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 ANTHELMINTIKA.....	9
2.1.1 BENZIMIDAZOLY.....	9
2.1.2 ALBENDAZOL.....	10
2.1.3 REZISTENCE NA ANTHELMINTIKA.....	11
2.2 EKOTOXICITA VETERINÁRNÍCH LÉČIV.....	13
2.2.1 EKOTOXICITA ANTHELMINTIK.....	14
2.3 JETEL LUČNÍ.....	16
2.4 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK U ROSTLIN.....	18
2.5 ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM ROSTLIN.....	19
2.5.1 VYBRANÉ ANTIOXIDAČNÍ ENZYMY.....	19
2.6 ROSTLINNÉ PIGMENTY.....	23
2.6.1 VYBRANÁ ROSTLINNÁ BARVIVA.....	23
3. CÍL PRÁCE.....	26
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
4.1 CHEMIKÁLIE A REAGENCIE.....	27
4.2 PŘÍSTROJE.....	27
4.3 PROGRAMY.....	28
4.4 PŘÍPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU.....	28
4.4.1 PĚSTOVÁNÍ ROSTLIN JETELE LUČNÍHO.....	28
4.4.2 PŘÍPRAVA TRUSU.....	29
4.4.3 APLIKACE TRUSU.....	30
4.4.4 VZORKOVÁNÍ ROSTLIN.....	31
4.4.5 PŘÍPRAVA PUFRU PRO IZOLACI SUBCELULÁRNÍCH FRAKČÍ.....	31
4.4.6 PŘÍPRAVA SUBCELULÁRNÍCH FRAKČÍ.....	31
4.4.7 STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN PODLE BRADFORDOVÉ... 32	
4.5 STANOVENÍ AKTIVITY ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ.....	33
4.5.1 STANOVENÍ AKTIVITY KATALÁZY.....	33

4.5.2	STANOVENÍ AKTIVITY SUPEROXIDDISMUTÁZY	35
4.5.3	STANOVENÍ AKTIVITY AKORBÁTPEROXIDÁZY	36
4.5.4	STANOVENÍ AKTIVITY PEROXIDÁZY	36
4.5.5	STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHIONPEROXIDÁZY	37
4.5.6	STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHIONREDUKTÁZY	37
4.5.7	STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHION-S-TRANSFERÁZY	38
4.6	PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ PRO MĚŘENÍ ROSTLINNÝCH PIGMENTŮ	38
4.6.1	MĚŘENÍ KONCENTRACE ROSTLINNÝCH PIGMENTŮ	39
5.	VÝSLEDKY	40
5.1	STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN - ČÁST 1	40
5.2	AKTIVITA ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ ČÁST 1.	42
5.2.1	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY KATALÁZY ABZ	42
5.2.2	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY SUPEROXIDDISMUTÁZY ABZ	44
5.2.3	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY ASKORBÁTPEROXIDÁZY ABZ	45
5.2.4	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY PEROXIDÁZY ABZ	46
5.2.5	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHIONPEROXIDÁZY ABZ	48
5.2.6	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHIONREDUKTÁZY ABZ	48
5.2.7	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHION-S-TRANSFERÁZY ABZ	49
5.3	STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN – ČÁST 2.	50
5.4	AKTIVITA ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ – ČÁST 2.	52
5.4.1	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY KATALÁZY ABZ	52
5.4.2	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY SUPEROXIDDISMUTÁZY ABZ	54
5.4.3	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY ASKORBÁTPEROXIDÁZY ABZ	55
5.4.4	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY PEROXIDÁZY ABZ	56
5.4.5	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHIONPEROXIDÁZY ABZ	58
5.4.6	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHIONREDUKTÁZY ABZ	58
5.4.7	OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHION-S-TRANSFERÁZY ABZ	59
5.5	SPECIFICKÉ AKTIVITY ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ KONTROLNÍCH ROSTLIN JETELE V ROCE 2019 A 2020	60
5.5.1	OVLIVNĚNÍ KONCENTRACE ROSTLINNÝCH PIGMENTŮ ABZ	63
6.	DISKUZE	64
7.	ZÁVĚR	69
8.	SEZNAM ZKRATEK	70
9.	POUŽITÁ LITERATURA	72

1. ÚVOD

Anthelmintika jsou léčiva využívaná pro prevenci a terapii infekčních onemocnění způsobených helminty. Ve velkém množství jsou využívány hlavně ve veterinární medicíně (Cooke et al., 2017).

Nebezpečí této skupiny léčiv spočívá v jejich následném vylučování do ekosystému jako metabolitů nebo nezměněných mateřských sloučenin. Do životního prostředí se dostávají různými cestami, a to buď přímo močí a exkrementy léčených zvířat nebo nepřímo aplikací kontaminovaných hnojiv. V obou případech dochází k transportu a distribuci těchto látek do vod, sedimentů, půdy a bioty. Tímto způsobem se stávají nebezpečné pro necílové organismy, včetně rostlin (Bártíková et al., 2016).

Rostliny jsou otevřené systémy komunikující s prostředím, ve kterém se vyskytují. Mají tedy schopnost kontaminanty přijímat, metabolizovat a akumulovat. Pro rostliny představují kontaminanty potenciální nebezpečí s možností vzrůstu oxidačního stresu (ROS). Z tohoto důvodu si rostliny vytvořily detoxikační mechanismy včetně enzymů, které jsou schopny metabolizovat xenobiotika (Vaněk et al., 2017).

Tato práce se zabývala vlivem albendazolu (ABZ), léčiva ze skupiny benzimidazolových anthelmintik, na aktivitu vybraných antioxidačních enzymů a množství vybraných rostlinných pigmentů v jeteli lučním (*Trifolium pratense*).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ANTHELMINTIKA

Anthelmintika, léčiva určená k léčbě helmintóz, jsou široce používána v humánní i veterinární medicíně. Anthelmintika působí různými mechanismy – parazitické červy mohou usmrctvat, paralyzovat nebo inaktivovat (Opletalová, 2006). Většinou se jedná o syntetické látky, avšak některé z nich jsou připravovány biosynteticky. Podle účinku na cílový organismus rozlišujeme anthelmintika na antinematoda proti hlísticím (*Nematoda*), antitremitoda proti motolicím (*Trematoda*) a anticestoda proti tasemnicím (*Cestoda*). Zástupci anthelmintik působí proti dospělým červům a jejich vývojovým stádiím. Některá anthelmintika jsou dokonce ovicidní, což znamená, že dokážou potlačit vývoj vajíček helmintů (Ducháček a Lamka, 2008).

V dnešní době je terapie helmintóz závislá pouze na podávání anthelmintik. Ovšem na prevenci těchto onemocnění se do určité míry také podílí vakcinace hostitelů. Další z možností prevence proti helmintózám je zásah do životního cyklu parazita. To lze uskutečnit například omezením disperze vajíček v exkrementech a moči hostitelů vhodným kompostováním, spalováním nebo chemickou úpravou. Nicméně touto cestou dochází k zásahu do životního prostředí a tím dalšímu vlivu člověka na ekosystém, proto je nutné tento vliv zvážit (Volf a Horák, 2007).

Napadnutí zvířat helminty znamená velkou zátěž pro zdraví jedinců a vede k velkým ztrátám zvířat a snížení jejich produktivity. Proto by úspěšná terapie zvířat měla dodržovat kombinaci zoohygienických opatření a využití rozsáhlé skupiny různorodých léčiv ze skupiny anthelmintik (Ducháček a Lamka, 2008).

2.1.1 BENZIMIDAZOLY

Skupina benzimidazolových anthelmintik aktuálně patří mezi nejrozsáhlejší skupinu antinematod s nejširší anthelmintickou účinností. Mají vliv na všechny stadia vývoje červů a to vajíčka, larvy i dospělé jedince. U některých benzimidazolů nalezneme kromě antinematodní aktivity i aktivitu antitremitodní a anticestodní. Výjimečně můžeme pozorovat aktivitu antimykotickou, která ovlivňuje rychlost rozkladu hnoje na pastvinách (McKellar, 1997; Ducháček a Lamka 2014).

K benzimidazolovým anthelmintikům, které se využívají ve veterinární praxi řadíme: fenbendazol, albendazol, flubendazol, mebendazol, tiabendazol, triklabendazol a oxibendazol. (Ducháček a Lamka, 2008).

Účinek těchto léčiv spočívá v blokování syntézy β -tubulinových subjednotek mikrotubulů v buňkách parazita, což vede k zastavení buněčného dělení v metafázi. Také brání vstupu glukózy do buněk, čímž dochází ke snížení produkce glykogenu a ATP. Tyto procesy rozvrátí mimo jiné energetický metabolismus, udržování tvaru buňky, buněčný pohyb, vylučování a jiné. Výsledkem je destrukce organismu helminta (Ducháček a Lamka, 2008).

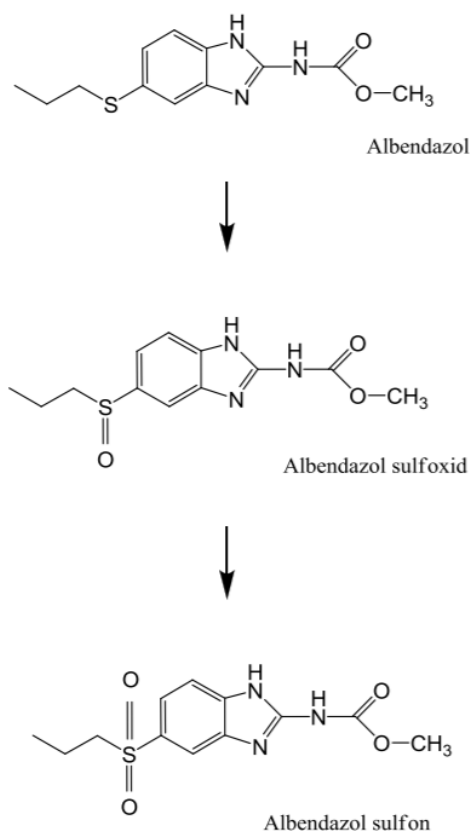
Nevýhodou benzimidazolů je jejich ztížená absorpce z gastrointestinálního traktu, mají totiž velmi nízkou rozpustnost ve vodě. Tento problém lze řešit podáním léčiv společně s potravou. Absorbované léčivo podléhá jaterní biotransformaci. Vylučování probíhá ve větší míře žlučí (většina benzimidazolů). Nicméně albendazol má schopnost se vylučovat, jak žlučí, tak i močí (Maddison et al., 2008).

Některé benzimidazoly (fenbendazol, febantel, albendazol) mají teratogenní účinky, nicméně byly pozorovány pouze v kritické fázi vývoje plodu. Rozsah teratogenních účinků byl dán dávkou léčiva a druhem zvířete (Maddison et al., 2008; Makawy et al., 2006).

2.1.2 ALBENDAZOL

Albendazol je širokospektré benzimidazolové anthelmintikum vyvinuté v roce 1973 společností Smith Kline & French. Jedná se o důležité antiparazitikum využívané u přežvýkavců, hlavně u ovcí a skotu. Albendazol má nejširší spektrum účinků ze všech dostupných benzimidazolů. Účinkuje proti hlísticím, motolicím, tasemnicím a prvokům hospodářských zvířat. Má ovocidní účinky, čímž snižuje kontaminace pastvin (Maddison et al., 2008).

Albendazol se velmi rychle metabolizuje v játrech. V důsledku sulfidové oxidace albendazolu vznikají dva metabolity (Obr. 1). Primární metabolit je enantiomerní albendazol sulfoxid (ABZSO). Je známý jako ricobendazol a přisuzuje se mu hlavní anthelmintická účinnost. Sekundárním metabolitem je albendazol sulfon (ABZSO₂), u kterého anthelmintická účinnost nebyla prokázána (Horvat et al., 2012).



Obrázek 1 Metabolické přeměny albendazolu (Dayan, 2003)

ABZSO se v organismu váže ze 70 % na bílkoviny krevní plazmy a dobře se v organismu distribuuje. Nejčastěji je detekován v moči, žluči, játrech, v nitrech cyst i v cerebrospinální tekutině. Léčivo se hůře absorbuje ze zažívacího traktu, vzhledem k nízké rozpustnosti ve vodě. U dobytka se vstřebává pouze 50 % perorálně podávané dávky (Bloom et al. 2013; Seidlová, 2013).

2.1.3 REZISTENCE NA ANTHELMINTIKA

Anthelmintickou rezistenci lze definovat jako geneticky přenášenou ztrátu citlivosti na léčiva v populacích helmintů, kteří byli dříve na tato léčiva citliví. Zásadní problém vznikl, když se anthelmintika začala podávat v neoptimálních dávkách a často docházelo ke kontinuálnímu užívání pouze jedné třídy léčiv (Ihler et al., 2010). Tento nevážený způsob podávání anthelmintik, hlavně u hospodářských zvířat, vedl k rapidnímu vzrůstu prevalence rezistence na dnes dostupná anthelmintika (Kaplan et al., 2012).

V dnešní době byl zaznamenán výskyt rezistence na všechny třídy širokospektrých anthelmintik, která jsou k dispozici, včetně výskytu multirezistence.

Rezistentní populace hlístic jsou detekovány u všech přirozeně se pasoucích druhů ovcí, koz, skotu a koní (Ihler et al., 2010).

U helmintů platí, že čím častěji se dostávají do kontaktu s anthelmintiky, tím nastává větší pravděpodobnost vývoje rezistence. Při kontaktu s anthelmintikem dochází k usmrcení většiny helmintů senzitivních na dané léčivo. Malá část helmintů dokáže přežít, nadále se množit a svými geny přispět k příští rezistentní generaci (Sangster, 1999).

Problém anthelmintické rezistence by potencionálně mohly vyřešit nové anthelmintické třídy s novými mechanismy účinku, avšak vývoj nových léků je finančně náročný (Kaplan et al., 2012).

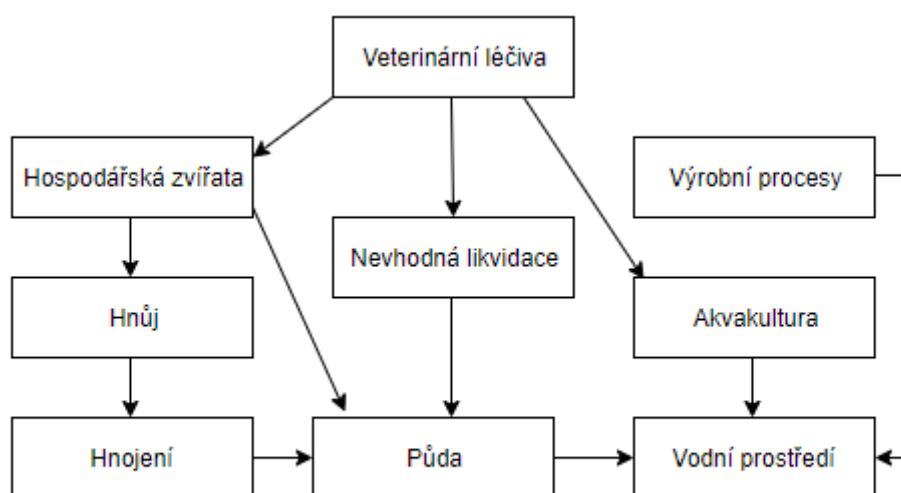
2.2 EKOTOXICITA VETERINÁRNÍCH LÉČIV

Vývoj nových veterinárních léčiv za posledních 40 let umožnil chránit zdraví hospodářských, domácích a divokých zvířat. Veterinární léčiva hrají důležitou roli v zemědělství, udržitelnosti a výrobě cenově dostupnějších a kvalitnějších potravin (Boxall et al., 2005).

Přestože se vedlejší účinky léčiv na zdraví lidí a zvířat obvykle testují v důkladných studiích bezpečnosti a toxicity, potenciální dopady výroby a používání léčivých přípravků na životní prostředí jsou méně známé. Vzhledem k samotné povaze léčiv mohou mít nezamýšlené účinky na zvířata, mikroorganismy i rostliny v životním prostředí (Boxall, 2004).

Veterinární léčiva se tedy mohou vylučovat do životního prostředí ve formě původních sloučenin nebo metabolitů, které si mohou zachovat aktivitu (Horvat et al., 2012).

Po uvolnění do životního prostředí dochází k transportu a distribuci znečišťující látky do vody, půdy, sedimentů a bioty. Uvolňování léčiv do životního prostředí probíhá různými cestami. Antibakteriální látky využívané v akvakultuře se přímo uvolňují do povrchových vod. Veterinární léčivé přípravky používané k ošetření zvířat na pastvinách se vylučují do půd nebo povrchových vod. Při intenzivním ošetření hospodářských zvířat se tyto léky pravděpodobně dostanou do životního prostředí nepřímo aplikací hnoje. Mezi minoritní cesty vstupu patří emise do ovzduší a likvidace nepoužitých léků a obalů (Obr. 2) (Boxall et al., 2004; Boxall et al., 2006).



Obrázek 2 Znáornění možných příčin kontaminace životního prostředí. Upravené a přeložené z Boxall et al., 2004

Kontaminanty podléhají chemické a fotochemické biodegradaci, která přispívá k jejich eliminaci nebo reagují s jinými sloučeninami v životním prostředí.

Koncentrace každé z těchto sloučenin je určována řadou faktorů a procesů, včetně fyzikálně-chemických vlastností samotných sloučenin. Na koncentraci sloučenin se také podílí charakteristika prostředí a klimatické podmínky exponované oblasti (Boxall et al., 2004).

Metabolity a transformované sloučeniny v životním prostředí spolu s parentní látkou představují hrozbu pro vodní a suchozemské prostředí spojenou s poškozením necílových organismů (Bártíková et al., 2016).

Účinky kontaminantů z léčiv byly zaznamenány na fyziologii hmyzu, růstu vodních rostlin nebo vývoji rezistence mikroorganismů. Dále byl také pozorován vliv na rozklad hnoje. Jelikož o dopadech léčiv na životní prostředí a interakcích různých sloučenin je známo jen velmi málo, mělo by se preventivně snižovat uvolňování těchto látek. Snižování koncentrace léčiv a jejich metabolitů v životním prostředí může pomoci separace léčených zvířat od neléčených, správné odstraňování nepoužitých léčiv a nádob, vhodné uchovávání hnoje nebo poradenství o správných způsobech podávání veterinárních léčiv poskytované chovatelům (Boxall et al., 2004).

2.2.1 EKOTOXICITA ANTHELMINTIK

Veterinární léčiva k léčbě a prevenci nemocí u zvířat představují významný zdroj znečištění životního prostředí v důsledku intenzivní produkce v zemědělství a akvakultuře. Do životního prostředí vstupuje široká škála veterinárních léčivých přípravků, včetně anthelmintik (Bártíková et al., 2016).

Četné ekologické studie dokumentovaly přítomnost anthelmintik a jejich metabolitů v povrchových, podzemních a odpadních vodách, půdách a sedimentech. Vzhledem k těmto poznatkům je v současné době kontaminace životního prostředí předmětem intenzivních studií. Anthelmintika mohou být důležitými akutními a chronickými stresory působícími na mnohé organismy, včetně rostlin (Raisová Stuchlíková et al., 2018).

Další studie se zaměřily na studium účinků a osudu anthelmintik v rostlinách. Účinky vybraných anthelmintik byly studovány například na jitroceli kopinatém (*Plantago lanceolata*), zvonku okrouhlostém (*Campanula rotundifolia*) nebo rákosu obecném (*Phragmites australis*). Všechny uvedené rostliny byly schopny anthelmintika

absorbovat, biotransformovat na metabolity a uložit ve svých buňkách (Stuchlíková et al., 2018; Raisová Stuchlíková et al., 2018; Podlipná et al. 2013).

2.3 JETEL LUČNÍ

Jetel luční (*Trifolium pratense*, Obr. 3) patří do čeledi bobovité (*Fabaceae*). Je to běžný druh rostliny, která roste hojně po celém světě nejvíce však v mírném a subtropickém pásu severní polokoule. U nás roste především na lukách a pastvinách. Vhodné jsou pro něj hluboké, na živiny bohaté, suché až mírně vlhké půdy. Kromě toho, že velmi efektivně zúrodňuje půdu má také velký význam jako pícnina bohatá na bílkoviny. Jetel zároveň řadíme mezi důležité medonosné byliny a také je velmi oblíbený i v lidovém léčitelství (Hroneš, 2008; SalviaParadise, 2021).

Jetel patří mezi vytrvalé rostliny s dlouhým mohutným větveným kořenem a přímými až vystoupavými lodyhami. Rostliny dorůstají výšky až jednoho metru. Nejčastěji na rostlině najdeme trojčetné řapíkaté listy. Jednotlivé lístky jsou okrouhlé s bílou půlměsíčitou kresbou a krátkými řapíky. Velmi vzácně kvete bělavou barvou, nejčastěji však uvidíme růžové, přisedlé květy s asymetrickým kalichem. Plodem je lusk otvírající se víčkem (Hroneš, 2008; Deyl a Hísek).



Obrázek 3 Jetel luční (*Trifolium pratense*) (Středisko LIŠÁK Neratovice, 2019)

Jetel hraje důležitou roli zejména v zemědělství, a to díky své schopnosti obohacovat půdy o dusík fixovaný z ovzduší (Hejduk, 2012). Touto vlastností disponuje

mnoho rostlin z čeledi bobovitých, rostliny ji získaly symbiózou s bakteriemi rodu *Rhizobium*. Bakterie žijící v symbióze s rostlinami obvykle získávají energii přeměnou organických látek z prostředí. Hostitelské rostliny některým bakteriím poskytují organické látky (Mollerová, 2006; Kubát, 2012).

Těchto výhod si v minulosti hojně všímali zemědělci a po nové domestikaci v 16. století se stal jetel velmi využívanou píce. Úpadek v pěstování nastal až v polovině minulého století, kdy se rozmohla výroba průmyslových dusíkatých hnojiv, avšak v posledních letech se zájem o pěstování jetele opět vrátil. Hlavním důvodem byl zákaz krmení hospodářských zvířat masokostní moučkou. Tímto krokem došlo ke zvýšení ceny rostlinných bílkovinných krmiv a tím k vyhledávání levnějších a efektivnějších alternativ. Oblíbenou rostlinou se jetel stal i v ekologickém zemědělství, kde pěstované plodiny nesmějí být hnojeny dusíkatými minerálními hnojivy (Hejduk, 2012).

2.4 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK U ROSTLIN

Rostliny jsou otevřeným systémem, který komunikuje s okolním prostředím. Kromě látek nezbytných pro jejich vývoj je ovlivňují i látky cizorodé, které mají různou povahu a původ. K těmto cizorodým látkám patří i xenobiotika. V průběhu vývoje rostlin se evolučními procesy vyvinuly obranné mechanismy umožňující do jisté míry chránit organismy před působením těchto látek. U živočichů a mnohých mikroorganismů jsou mechanismy odbourávání xenobiotik dobře známy, u rostlin tomu tak není. Způsob vstupu a transport xenobiotik nebyl doposud zcela osvětlen. Rostliny eliminují toxickou látku uskladněním do kompartmentů, kde tolik neškodí. Nicméně nežádoucí látku musí chemicky pozměnit, aby ji vůbec mohly transportovat a uskladnit (Vaněk et al., 2017).

Jakmile xenobiotikum vstoupí do rostlinné tkáně, podléhá biochemickým reakcím. Rostliny obsahují enzymatické systémy, které odstraňují a detoxikují kontaminující látky (Schaffner et al., 2002).

Podle typu reakcí a zapojených enzymatických systémů lze detoxikační reakce rozdělit do tří kroků (Sandermann, 1992).

1. Fáze I zahrnuje přeměnu / aktivaci (oxidaci, redukcí a hydrolýzu) lipofilních xenobiotických sloučenin.
2. Fáze II zahrnuje konjugaci xenobiotických metabolitů fáze I nebo parentní látky s endogenními hydrofilními molekulami, jako jsou cukry, aminokyseliny, organické kyseliny a glutathion.
3. Ve fázi III (uskladnění, kompartmentace) mohou být vzniklé konjugáty xenobiotik uskladněny ve vakuolách nebo v buněčné stěně (Coleman et al., 1997).

2.5 ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM ROSTLIN

Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí závažně ohrožující rostlinu označujeme jako stresové faktory (stresory). Rostliny jsou v životním prostředí vystavovány různým stresovým faktorům, které ovlivňují jejich normální funkce. Nepříznivé účinky přispívají k akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS), které vznikají v organelách rostlinných buněk s vysokou oxidační metabolickou aktivitou (Mittler, 2002). Mezi ROS patří volné radikály jako jsou singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), superoxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) nebo hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$) (Anjum, 2016).

Rostliny si proto vyvinuly obranné mechanismy proti oxidačnímu poškození, které se aktivují během stresu a regulují toxické hladiny ROS. Rovnováhu mezi produkcí a detoxikací ROS udržují enzymatické a neenzymatické antioxidační systémy (Mittler, 2002; Gill a Tuteja, 2010).

Enzymatické antioxidační systémy v rostlinách obecně zahrnují katalázu (CAT), superoxidodismutázu (SOD), askorbátperoxidázu (APX), peroxidázu (POX), glutathionperoxidázu (GPX), glutathionreduktázu (GR), glutathion-S-transferázu (GST), monodehydroaskorbátreduktázu (MHDAR), dehydroaskorbátreduktázu (DHAR) a guajakolperoxidázu (GOPX) (Ruifen et al., 2021).

Neenzymatické antioxidační systémy zahrnují nízkomolekulární metabolity v rostlinách, jako jsou kyselina askorbová (AsA), glutathion (GSH), fenolové sloučeniny, alkaloidy, aminokyseliny a tokoferoly (Ruifen et al., 2021).

2.5.1 VYBRANÉ ANTIOXIDAČNÍ ENZYMY

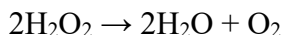
Ze všech antioxidačních enzymů jsme se zaměřili pouze na enzymy CAT, SOD, APX, POX, GPX, GR a GST.

2.5.1.1 KATALÁZA

CAT je tetramerní enzym obsahující prostetickou skupinu hem. Ochranné funkce enzymu jsou lokalizovány nejhojněji v peroxisomech, v menším množství se nachází v glyoxysomech a dalších organelách, ve kterých působí enzymy tvořící H_2O_2 (Dat et al., 2000).

CAT katalyzuje rozklad H_2O_2 na vodu (H_2O) a O_2 . Ochraňuje tak rostliny před škodlivými vlivy H_2O_2 , který může vznikat při fotorespiraci při oxidativním stresu v peroxisomech (Willekens et al., 1997; Borgeraas a Hessen, 2000). Dalo by se tedy

usuzovat, že zvýšená aktivita CAT odráží míru fotorespirace v peroxisomech (Sekmen et al., 2012).



V přírodě existují tři izoformy CAT, kdy každá disponuje odlišnou funkcí: CAT1 odstraňuje H_2O_2 , který vzniká během fotorespirace; CAT2 může hrát roli v lignifikaci, avšak jejich biologická funkce zůstává doposud neznámá; CAT3 eliminuje H_2O_2 vznikající v glyoxysomech během degradace mastných kyselin (Ahmad et al., 2010).

2.5.1.2 SUPEROXIDDISMUTÁZA

SOD patřící do skupiny metaloenzymů tvoří první linii obrany proti ROS. Představuje jednu z hlavních enzymatických složek detoxikace superoxidových radikálů generovaných v biologickém systému (Gill et al., 2015).

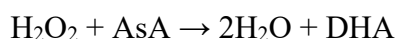
Vzhledem k tomu, že patří do skupiny metaloenzymů rozděluje se v závislosti na kovovém kofaktoru do třech typů: Fe-SOD lokalizován v chloroplastech; Mn-SOD lokalizován v mitochondriích, peroxisomech, a apoplastu; CuZn-SOD lokalizován v chloroplastech, peroxisomech a cytosolu (Del Río et al., 2002).

Rozmístění, distribuce a regulace různých SOD jsou organizovány adaptačním mechanismem na oxidační stres. Funkcí SOD je ochrana před cytotoxickým radikálem $\text{O}_2^{\cdot-}$ přeměnou na O_2 a H_2O_2 (Perez-Lopez et al., 2009).



2.5.1.3 ASKORBÁTPEROXIDÁZA

APX hraje velmi důležitou roli v ochraně buněk proti ROS. Enzym je lokalizován v chloroplastech, mitochondriích a cytosolu rostlinných buněk, ze kterých odstraňuje H_2O_2 . Funkce APX se ovšem neobejde bez askorbátu (AsA), který využívá jako donor elektronů k redukci H_2O_2 na H_2O . Další produkt, který touto reakcí vzniká je monodehydroaskorbát (DHA) (Asada, 1992).



Zmíněné reakce se účastní askorbát-glutathionového cyklu (AsA-GSH) (Saed-Moucheshi et al., 2014), který je hlavní cestou antioxidační obrany detoxikace H_2O_2

v rostlinné buňce. AsA-GSH se skládá ze čtyř enzymů (APX, MDHAR, DHAR a GR) a dvou antioxidantů (AsA a GSH). Prvním enzymem cyklu je APX, který detoxikuje H₂O₂ pomocí AsA, za vzniku H₂O a monodehydroaskorbátového radikálu (MDHA). MDHA je buď přímo redukován zpět na AsA pomocí MDHAR, nebo 2 molekuly MDHA samovolně dismutují na AsA a DHA. DHA je redukován na AsA pomocí DHAR za vzniku glutathion disulfidu (GSSG). GSSG je redukován GR a zároveň dochází k oxidaci nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH). Pokud by DHA nebyl redukován DHAR mohl by být nevratně hydrolizován na kyselinu 2,3-diketogulonovou (Pandey et al., 2015).

Kromě APX odstraňuje H₂O₂ i enzym CAT. Výhodou je nezávislost CAT na přítomnosti AsA jako donoru elektronů. Ovšem APX je široce distribuován a má lepší afinitu k H₂O₂, tímto se stává účinnějším zachycovačem H₂O₂ než CAT (Das a Roychoudhury, 2014).

2.5.1.4 PEROXIDÁZA

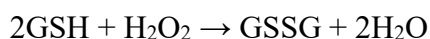
POX jsou enzymy patřící mezi oxidoreduktázy, což znamená, že katalyzují reakce, ve kterých dochází k výměně elektronů mezi jednotlivými substráty (Asada, 1992). Ve své struktuře obsahují hem a jsou složeny z jednoho peptidového řetězce. Lokalizovány jsou ve vakuolách, buněčných stěnách a cytosolu (Vaseva et al., 2012).

POX společně s enzymy CAT a APX odbourává H₂O₂ (Vicuna, 2005). Zvýšené množství enzymu může být zapříčiněno *de novo* syntézou nebo uvolňováním z membrán spuštěné zvýšenou koncentrací H₂O₂ (Huseynova, 2012).

2.5.1.5 GLUTATHIONPEROXIDÁZA

GPX patří do velké skupiny různorodých enzymů účastnících se AsA-GSH cyklu (Mittova et al., 2003).

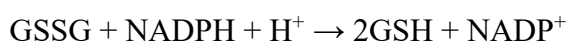
K redukci H₂O₂ a detoxikaci produktů lipidové peroxidace využívá GSH, který se řadí mezi nejvýznamnější činitele antioxidačního obranného systému buňky. Tímto mechanismem pomáhá chránit rostlinné buňky proti oxidativnímu stresu. GPX tedy katalyzuje rozklad H₂O₂ na H₂O a zároveň oxiduje GSH (Ahmad et al., 2008).



Hlavní funkcí rostlinných GPX je zabránit oxidačnímu poškození a následné programované buněčné smrti v důsledku stresu (Chen et al., 2004).

2.5.1.6 GLUTATHIONREDUKTÁZA

GR patří do skupiny enzymů oxidoreduktáz závislých na NADPH. Jako součást dráhy AsA-GSH hraje GR důležitou roli při detoxikaci ROS, regeneraci GSH a zvyšování tolerance vůči abiotickému stresu u rostlin. Katalyzováním redukce GSSG na GSH s doprovodnou oxidací NADPH účinně udržuje správnou redoxní rovnováhu v buňkách (správný poměr GSH/GSSG) (Gill et al., 2013; Saed-Moucheshi et al., 2014).

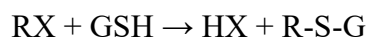


Ačkoli se GR nachází v chloroplastech, cytosolu a mitochondriích většina jeho aktivity v rostlinných tkáních je lokalizována v chloroplastech (Gill et al., 2013).

2.5.1.7 GLUTATHION-S-TRANSFERÁZA

Rostlinné GST patří do skupiny intracelulárních enzymů podílejících se na různých mechanismech uvnitř buněk, jako je primární a sekundární metabolismus, stresové odpovědi, regulace apoptózy, detoxikace herbicidů a ochrana rostlin před xenobiotiky (Estévez a Hernández, 2020). GST vyskytující se v rostlinách jsou většinou cytosolické. (Pascal a Scalla, 1999).

Tato velká skupina enzymů se podílí na odstranění nebezpečných elektrofilních xenobiotických substrátů (RX). Reakce probíhá jako konjugace RX s tripeptidem glutathionem (Marrs, 1996).



2.6 ROSTLINNÉ PIGMENTY

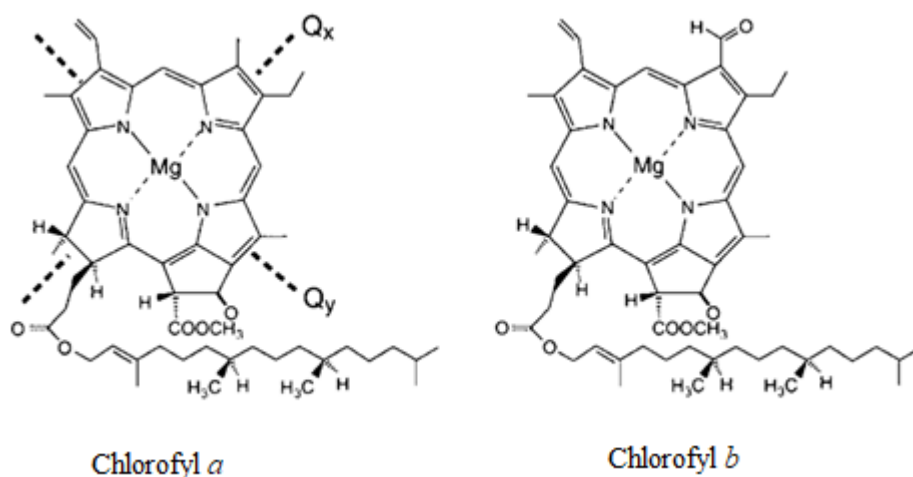
Zdravotní stav rostlin lze charakterizovat pomocí intenzity fotosyntézy, kterou využívají fotoautotrofní organismy. Fotosyntéza je soubor procesů, které přeměňují energii záření na energii chemickou. Pro fotosyntézu jsou významné fotosynteticky aktivní barviva, která absorbují elektromagnetické záření. Množství pigmentu v organismech závisí na mnoha faktorech. Mezi nejdůležitější faktory patří druh rostliny, vývojové stádium, minerální výživa a podmínky růstu (rozdíl mezi stinnými a slunnými listy). Stav fotosyntetického aparátu tedy určuje obsah a složení pigmentů. Fotosyntetické pigmenty se rozdělují do dvou skupin, a to na zelené chlorofyly a žluté, oranžové až červené karotenoidy (Gloser, 2012).

Množství pigmentů v rostlinách lze stanovit různými způsoby. Jedním ze způsobů je destruktivní metoda založená na extrakci barviv z pletiv a jejich následné spektrofotometrické měření. Druhou metodou je stanovení pomocí optických přístrojů, chlorofylmetrů nebo ze snímků dálkového průzkumu Země (Gholizadeh et al., 2015).

2.6.1 VYBRANÁ ROSTLINNÁ BARVIVA

2.6.1.1 CHLOROFYL

Chlorofyl patří mezi nejčastěji se vyskytující pigmenty, které jsou obsaženy v rostlinách, sinicích a některých druzích řas. Absorbovanou energii využívá k syntéze sacharidů z oxidu uhličitého a vody. V bílém světle, které na něj dopadá, má zelenou barvu. Chlorofyly se dělí na několik forem (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*, a *f*), nicméně nejznámější a zároveň nejdůležitější je chlorofyl *a* a *b*. Rozdíl mezi těmito chlorofyly je pouze v chemickém složení (Obr. 4) (Paarek et al., 2017).



Obrázek 4 Vzorec chlorofylu *a* a *b* (Croft a Chen, 2018)

Na obsah chlorofylu v pletivech rostlin mají vliv abiotické a biotické faktory, minerální prvky či hnojiva. Tyto faktory limitují intenzitu fotosyntézy a tím i další biochemické pochody v rostlině, včetně ochranných mechanismů (Guidy et al., 2019).

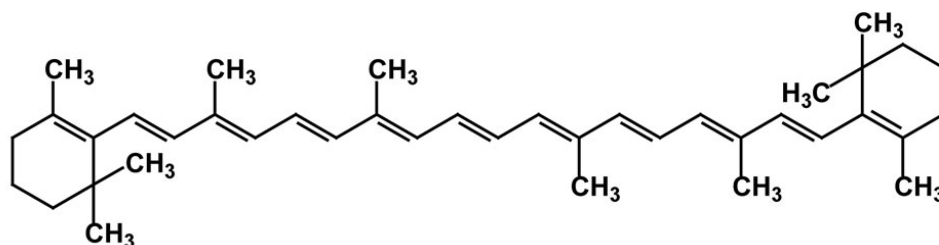
Určení množství chlorofylu v rostlinách má mnoho významů. Jeho stanovení lze použít jako indikátor fotosyntetické aktivity a tím i celkového zdravotního stavu rostlin, ke zjištění a hodnocení stresu, zkoumání fyziologie nebo může sloužit jako indikátor nutričního stavu rostlin (Zemek et al., 2014).

2.6.1.2 KAROTENOIDY

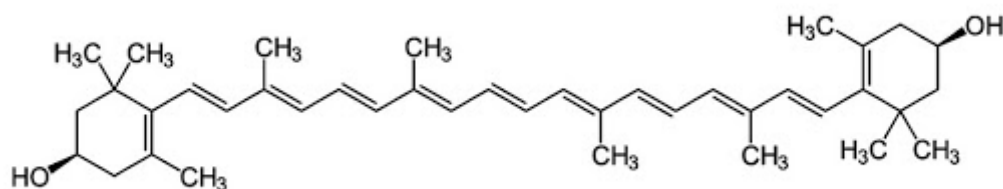
Karotenoidy patří mezi druhé nejvíce se vyskytující rostlinné pigmenty na Zemi. Jejich syntéza probíhá ve všech fotosynteticky aktivních a některých nefotosynteticky aktivních organismech (Hopkins a Huner, 2008). Karotenoidy jsou řazeny mezi vedlejší světlo sběrné pigmenty, které zachycují energii slunečního záření ve fotosynteticky aktivních organismech. Jejich hlavní funkce spočívá v zachytávání slunečního záření o vlnové délce v rozmezí 450-570 nm (Pan et al., 2011).

Chemické vlastnosti podmiňují rozdělení karotenoidů na dvě skupiny. První skupinou jsou karoteny, vyznačující se oranžovým až červeným zbarvením. Druhou skupinu jsou xantofyly, typické žlutou pigmentací. Mezi nejvýznamnější karoteny patří β -karoten, α -karoten a lykopen, mezi xantofyly řadíme lutein a zeaxantin (Hopkins a Huner, 2008). Rostlinné pigmenty karotenoidů jsou syntetizovány *de novo* pouze v plastidech (Rodríguez-Concepción, 2010).

Tvorba karotenoidů u rostlin je velmi důležitá kvůli jejich antioxidačním vlastnostem. U karotenů je antioxidační funkce připisována převážně β -karotenu (Obr. 5). Ze skupiny xantofylů je to zeaxantin (Obr. 6) (Havaux et al., 2007).



Obrázek 5 Vzorec β -karotenu (Shutterstock, 2021)



Obrázek 6 Vzorec zeaxantinu (Shutterstock, 2021)

Karotenoidy lze tedy zařadit nejen mezi fotosyntetické pigmenty, ale i mezi antioxidanty, které se podílejí na zhášení tripletních excitovaných stavů chlorofylu (3Chl*) a dalších škodlivých radikálů, čímž zvyšují přežití rostlin v různých klimatických podmínkách (Alboresi et al., 2011; Burton a Ingold, 1984).

3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zjistit vliv anthelmintika ABZ na vybrané antioxidační enzymy a rostlinné pigmenty jetele lučního (*Trifolium pratense*) v životním prostředí.

Dosažení cíle zahrnovalo:

- Ovlivnění jetele lučního ABZ
- Zpracování rostlinného materiálu (listů) do podoby subcelulárních frakcí a extraktů
- Stanovení koncentrace bílkovin u kontrolních a ovlivněných vzorků
- Stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů CAT, SOD, APX, POX, GPX, GR a GST u kontrolních a ovlivněných vzorků
- Stanovení koncentrace rostlinných pigmentů u kontrolních a ovlivněných vzorků
- Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 CHEMIKÁLIE A REAGENCIE

1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) (Penta)

Anilin (Sigma)

Coomassie Brilliant blue G-250 (CBBG) (Sigma)

Dithiothreitol (DTT) (Fluka)

Glutathion (GSH) (Kochlight Laboratories)

Glutathion disulfid (GSSG) (Sigma Aldrich)

Glutathionreduktáza (GR) (Sigma)

Guajakol (Sigma Aldrich)

Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma Aldrich)

Kyselina askorbová (Penta)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma Aldrich)

Molybdenan amonný (Lachema)

Nikotinamidadenindinukleotid fosfát redukovaný (NADPH) (Sigma Aldrich)

Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma)

Polyvinylpyrolidon (PVP) (Sigma Aldrich)

Pyrokatechol (Lachema)

T-butyl hydroperoxid (Sigma Aldrich)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid (TRIS HCl) (Penta)

4.2 PŘÍSTROJE

Analytické váhy, Scaltec

Automatické pipety Eppendorf

Centrifuga, Biofuge Stratos Heraeus

Homogenizátor, MP Fast Prep

Magnetické míchadlo, IKA Color Squid Wildcat Stirrer

pH metr, WTW InoLab

Spektrofotometr, Tecan infinite M200

Spektrofotometr, Tecan Spark

Stolní třepačka, Minishaker MS2

Thermomixer, Eppendorf comfort

Třepačka, Heidolph

Ultrazvukový homogenzátor, Bandelin Sonoplus HD 2070

4.3 PROGRAMY

Počítačový program i-control

Microsoft Excel

GraphPad Prism 9.0.2

4.4 PŘÍPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

4.4.1 PĚSTOVÁNÍ ROSTLIN JETELE LUČNÍHO

Ovlivnění rostlin jetele lučního ABZ probíhalo ve zcela přirozených environmentálních podmínkách. Experiment se uskutečnil v zemědělském družstvu v Býšti (Zemědělská akciová společnost Býšť, 533 22 Býšť 169), kde byly splněny podmínky pro pěstování vybraných rostlin (Obr. 7). Zpracování vzorků a jejich následné studium bylo provedeno na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci králové.

Diplomová práce je rozdělena na dvě části mezi roky 2019-2020. První část studie probíhala na jaře 2019, kdy byly 27.2. ovlivněny první rostliny jetele ABZ ve dvou koncentracích s následným sběrem vzorků v květnu téhož roku. Dále probíhalo zpracování odebraných vzorků. Druhá část probíhala v roce 2020. Příprava rostlin byla identická s předcházejícím rokem, až na aplikaci trusu ovcí léčených ABZ, která proběhla 2.3.2020.



Obrázek 7 Experimentální pole v Býšti

4.4.2 PŘÍPRAVA TRUSU

Trus pro experiment s ABZ má charakter směsného vzorku. Pochází od deseti samců ovčí (*Ovis aries*) s maximálním věkem jednoho roku. ABZ byl ovčím podán preventivně v dávce 10 mg/kg živé hmotnosti. Každá ovce byla samostatně ustájená. Trus byl sbírán po dobu 24 hodin od podání a celková hmotnost sbíraného trusu byla 5 kg. Pomocí kvartace byl vybrán reprezentativní vzorek (Obr. 8), který byl aplikován na experimentální pole. Zbytek vzorku byl zamražen na teplotu -20 °C.



Obrázek 8 Vzorky trusu s ABZ připravené pro aplikaci k rostlinám jetele lučního

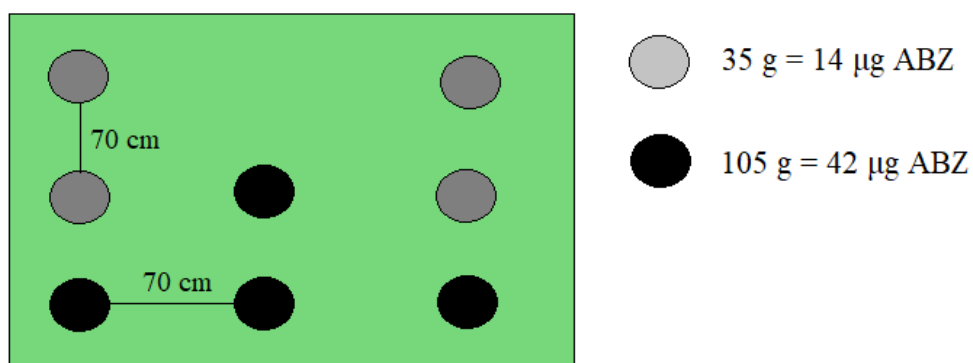
4.4.3 APLIKACE TRUSU

V první části studie bylo trusu vystaveno osm rostlin jetele lučního. Celkem vznikly dvě skupiny rostlinných vzorků. První skupina čítala čtyři rostliny a ke každé rostlině bylo aplikováno 35 g trusu (Obr. 9) o obsahu 14 μg ABZ. Druhá skupina čítala taktéž čtyři rostliny, ale bylo aplikováno větší množství trusu a to 105 g s obsahem 42 μg ABZ. Trus byl aplikován jednotlivě, ke každé centrální rostlině (Obr. 10).

Vzhledem k tomu, že první část studie byla pilotní, počítalo se s dalšími možnými úpravami provedení experimentu. Proto u druhé části došlo ke změně množství aplikovaného trusu. Centrální rostliny byly hnojeny pouze 105 g trusu s obsahem 42 μg ABZ. Počet rostlin byl ve skupině zachován. Obě části studie obsahovaly i kontrolní vzorky rostlin, které nebyly ovlivněny ABZ.



Obrázek 9 Trus aplikovaný k rostlině jetele lučního o hmotnosti 35 g



Obrázek 10 Umístění centrálních rostlin jetele lučního na experimentálním poli a aplikace trusu s obsahem ABZ

4.4.4 VZORKOVÁNÍ ROSTLIN

Vzorkování rostlin probíhalo před první sečí. Důvodem tohoto postupu byla snaha co nejdříve napodobit „sklizení“ rostlin, které jsou následně využity jako krmivo pro hospodářská zvířata. Odebrání vzorků tedy probíhalo jako simulace sečení tzn. odstříhnutí celé rostliny 3 cm od země. Rostliny byly ukládány na suchý led a následně uskladněny při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z takto připravených rostlin byly vytvořeny subcelulární frakce a extrakty pro měření aktivity antioxidantních systémů a pigmentů Jetele lučního.

4.4.5 PŘÍPRAVA PUFRU PRO IZOLACI SUBCELULÁRNÍCH FRAKČÍ

Před přípravou subcelulárních frakcí bylo nutné vytvořit zásobní pufr určený k přípravě pufru pro izolaci subcelulárních frakcí. Zásobní 50 mM Na-fosfátový pufr $\text{pH}=7$ byl připraven z:

- 500 ml 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ tj. 8,95 g / 500 ml
- 250 ml 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tj. 1,95 g / 250 ml

Oba roztoky byly slévány za stálého míchání na magnetické míchačce do dosažení požadovaného $\text{pH}=7$.

Pufr pro přípravu subcelulárních frakcí z rostlinných vzorků byl připraven z:

- 200 ml 50 mM Na-fosfátového pufru $\text{pH}=7$
- 2 g PVP
- 77 mg DTT
- 6 mg EDTA

Všechny navážené chemikálie byly rozpuštěny v Na-fosfátovém pufru pomocí magnetické míchačky. Vzniklý pufr byl přelitý do zásobní lahve a uchováván v lednici.

4.4.6 PŘÍPRAVA SUBCELULÁRNÍCH FRAKČÍ

Pro přípravu subcelulárních frakcí byly použity pouze listy rostlin. Jednotlivé rostliny ovlivněné ABZ byly vytaženy z mrazících boxů a ihned zpracovány pomocí třecí misky s tloučkem, kde byly listy rostlin rozmělněny a zhomogenizovány na suchém ledu. Vzorky byly přendány na misky a zváženy. Následně byl materiál přendán do centrifugačních kyvet společně s pufrem určeným k izolaci subcelulárních frakcí z rostlin. Takto vytvořený roztok byl zhomogenizovaný ultrazvukovým

homegenizátorem a zcentrifugovaný (stočení při 20 000 g, 30 min při 4 °C). Vzniklý supernatant byl v chladu promíchaný na magnetické míchače a následně rozpipetovaný analytickou pipetou do předem připravených a popsanych plastových zkumavek Eppendorf. Každá zkumavka obsahovala 0,5 ml supernatantu. Posledním krokem bylo zmrazení rozpipetovaného supernatantu na -80 °C.

4.4.7 STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN PODLE BRADFORDOVÉ

Ke stanovení koncentrace proteinů v rostlinách byla využita metoda podle Bradfordové. Princip stanovení spočívá v navázání proteinů na CBBG v kyselém prostředí, což vede ke změně barvy z červeno-hnědé na modrou. Za vzniku komplexu barvivo-protein dochází k posunu maximální absorbance z 465 nm na 595 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci bílkoviny (Jones et al., 1989).

Pro určení koncentrace je nutné stanovit kalibrační závislost. V tomto případě byl jako kalibrační protein použitý BSA o koncentraci 2 mg/ml. Koncentrace standardů byla v rozmezí 0-1400 µg/ml. Vzorky pro kalibraci byly připraveny podle Tabulky 1.

Tabulka 1 Příprava roztoků a standardů ke kalibrační křivce

	Koncentrace	Roztok BSA (2 mg/ml)	10 mM PBS
1	0 µg/ml	0 µl	500 µl
2	200 µg/ml	50 µl	450 µl
3	400 µg/ml	100 µl	400 µl
4	600 µg/ml	150 µl	350 µl
5	800 µg/ml	200 µl	300 µl
6	1000 µg/ml	250 µl	250 µl
7	1200 µg/ml	300 µl	200 µl
8	1400 µg/ml	350 µl	150 µl

Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky typu GAMA bylo napipetováno 5 µl vzorku bílkovin. Následně bylo multikanálovou pipetou přidáno 200 µl roztoku CBBG, který byl vytemperován na pokojovou teplotu. Jako slepý vzorek bylo napipetováno 5 µl pufru. Destička byla inkubována 30 minut při teplotě 25 °C

v Thermomixeru při třepání 300 rpm. Absorbance byla měřena při 595 nm na přístroji Tecan.

4.5 STANOVENÍ AKTIVITY ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ

Všechny zjištěné aktivity antioxidantních enzymů byly přepočítány na specifickou aktivitu. Přepočet byl proveden na základě hodnot koncentrace proteinů v biologickém materiálu. Aktivita byla přepočítána z U na U/mg.

4.5.1 STANOVENÍ AKTIVITY KATALÁZY

Stanovení aktivity katalázy pomocí reakce molybdenanu amonného

Principem metody je tvorba žlutého komplexu, který je tvořen reakcí molybdenanu amonného a peroxidu vodíku. Absorbance je měřena v mikrotitračních destičkách při vlnové délce 405 nm (Góth, 1991).

Absorbance byla měřena přístrojem Tecan. Složení jednotlivých slepých vzorků (v tabulkách uváděn jako blank) a vzorků je uvedeno v Tabulce 2.

Složení a příprava jednotlivých roztoků:

1. 60 mM sodno-draselný fosfátový pufr (pH=7,4)

Pufr byl připraven sléváním dvou roztoků 10,74 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ rozpuštěného v 500 ml redestilované H_2O a 4,8 g KH_2PO_4 rozpuštěného v 500 ml redestilované H_2O do požadovaného pH 7,4.

2. 6,5 mM H_2O_2

Roztok byl připraven smícháním 14,78 μl 30% H_2O_2 s 20 ml sodno-draselného pufru.

3. 32,4 mM molybdenan amonný

Roztok byl připraven rozpuštěním 0,8 g molybdenanu amonného ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve 20 ml redestilované H_2O .

Tabulka 2 Složení jednotlivých vzorků a slepých vzorků

	Blank 1	Vzorek	Blank 2	Blank 3
1.	100 µl H ₂ O ₂	100 µl H ₂ O ₂	100 µl H ₂ O ₂	100 µl pufru
2.	100 µl molybd.	20 µl frakce	20 µl pufru	20 µl pufru
3.	Inkubace 1 minutu při 25 °C, třepání			
4.	-	100 µl molybd.	100 µl molybd.	100 µl molybd.
5.	1 minutu nechat stát			
6.	20 µl frakce	-	-	-
7.	Změřit absorbanci při 405 nm			

Do mikrotitrační destičky byly všechny roztoky kromě biologických frakcí pipetovány multikanálovou pipetou. Destička byla vložena do Thermomixeru na 1 minutu při 25 °C. Frakce by se měla pipetovat do slepého vzorku 1 co nejrychleji a nejlépe po částech. Měření absorbance probíhá ihned po napipetování frakce a je měřena při vlnové délce 405 nm.

Vzorec pro výpočet aktivity:

$$A \text{ (}\mu\text{mol/min)} = \frac{(ABl1 - AVz)}{ABl2 - ABl3} \cdot 32,5$$

Avz (absorbance vzorku), Abl1 (absorbance blanku 1), Abl2 (absorbance blanku 2), Abl3 (absorbance blanku 3)

Stanovení aktivity katalázy pomocí reakce peroxidu vodíku

Princip metody je založen na měření úbytku peroxidu vodíku ve vzorku (Verma, et al., 2003).

Do každé jamky mikrotitrační UV transparentní destičky bylo napipetováno 5 µl biologické frakce, 40 µl 200 mM H₂O₂ (230 µl, 30% zásobního roztoku H₂O₂ a 10 ml 100 mM KH₂PO₄ pufru o pH=7,00) a 255 µl 100 mM KH₂PO₄ pufru o pH=7,00). Změna absorbance byla měřena kineticky při vlnové délce 240 nm. Pro výpočet aktivity byl použitý rozdíl absorbance (ΔA/min) z oblasti lineárního poklesu.

4.5.2 STANOVENÍ AKTIVITY SUPEROXIDDISMUTÁZY

Princip metody spočívá v redukci WST-1 (tetrazoliová sůl) na formazanové barvivo v přítomnosti superoxidového aniontu (SOD Protocol, n.d.). Na měření aktivity SOD byl použitý set SOD AssayKit-WST (Sigma Aldrich). Ze setu byly použité celkem tři roztoky. Roztok tetrazoliové soli WST (1 ml WST; 19 ml ředícího pufru ze SOD setu), pracovní enzymatický roztok EWS (15 μ l roztoku enzymu; ředící pufr), ředící pufr.

Jednotlivé roztoky byly napipetovány do mikrotitrační destičky GAMA podle Tabulky 3. Dále byla destička inkubována při teplotě 25 °C po dobu 20 minut. Absorbance byla měřena na Tecanu, kineticky při vlnové délce 405 nm.

Tabulka 3 Množství jednotlivých roztoků pro vzorek a slepé vzorky

	Vzorek	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Biolog. frakce	20 μ l	-	20 μ l	-
dd H₂O	-	20 μ l	-	20 μ l
WST	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
Zředovací pufr	-	-	20 μ l	20 μ l
EWS	20 μ l	20 μ l	-	-

dd H₂O – redestilovaná voda

Z oblasti lineárního poklesu byl zjištěn rozdíl absorbance za čas ($\Delta A/\text{min}$), který byl použit pro výpočet aktivity (molární extinkční koeficient H₂O₂ 37 000 M⁻¹·cm⁻¹).

Vzorec pro výpočet koncentrace:

$$c = \frac{[(AB1 - AB13) - (AVz - AB12)]}{\epsilon \cdot l}$$

Vzorec pro výpočet aktivity:

$$A = \frac{(c \cdot V \cdot 50 \cdot 10^9)}{t}$$

c (koncentrace), AVz (absorbance vzorku), AB11 (absorbance blanku 1), AB12 (absorbance blanku 2), AB13 (absorbance blanku 3), ϵ (extinkční koeficient, 37000

$M^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), l (výška reakční směsi v jamce 0,9 cm), A (aktivita), V (objem reakční směsi 0,00024 l), t (čas 20 min)

4.5.3 STANOVENÍ AKTIVITY AKORBÁTPEROXIDÁZY

Princip reakce je založen na oxidaci kyseliny askorbové v přítomnosti peroxidu vodíku za vzniku dehydroaskorbátu (Nakano & Asada, 1987).

Absorbance byla měřená v UV transparentních mikrotitračních destičkách na přístroji Tecan Spark. Do každé jamky destičky bylo napipetováno 10 μl biologické frakce, 158 μl 50 mM fosfátového pufru, 14 μl roztoku kyseliny askorbové (9 ml H_2O ; 1 ml 50 mM fosfátového pufru; 10 mg kyseliny askorbové) a 18 μl 2 mM H_2O_2 (9 ml H_2O ; 1 ml 50 mM fosfátového pufru; 2 μl H_2O_2). Vše bylo pipetováno multikanálovou pipetou kromě biologické frakce. Změna absorbance byla měřena kineticky při vlnové délce 290 nm po dobu 5 minut. Pro výpočet aktivity byl použit rozdíl absorbance ($\Delta A/\text{min}$) z oblasti lineárního poklesu.

4.5.4 STANOVENÍ AKTIVITY PEROXIDÁZY

Stanovení aktivity peroxidázy pomocí anilinu a pyrokatecholu

Principem metody je rozklad peroxidu vodíku v reakci katalyzované peroxidasou. Komplex pyrokatechol-anilin slouží jako vodíkový donor pro stanovení peroxidasy. Přírůstek anilin-pyrokatecholu se zaznamenává fotometricky při vlnové délce 510 nm, kdy dochází k přeměně komplexu na růžově zbarvený produkt [4-(fenylamino)benzen-1,2-diol] (Molaei Rad et al., 2007).

U metody byl připraven 0,2 M sodno-draselný pufr pH=7,00 (38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ rozpustit v 500 ml redestilované H_2O ; 7,8 g rozpustit v 250 ml redestilované H_2O ; oba roztoky slévat do dosažení pH 7,00).

Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 90 μl substrátu (0,1872 g pyrokatecholu; 2,28 μl anilinu; 10 ml sodno-draselného pufru) a 100 μl H_2O_2 (3,87 μl 30% roztoku H_2O_2 ; 20 ml sodno-draselného pufru). Substrát byl připraven těsně před přidáním do destičky z důvodu nestálosti a uchováván na temném místě. Destička se nechala preinkubovat v termomixéru 4 minuty při teplotě 25 °C. Po preinkubaci bylo přidáno 10 μl biologické frakce do vzorku a byl připraven i slepý vzorek (přidání 10 μl 0,1 M sodno-draselného fosfátového pufru), což vedlo ke startu reakce. Vzorky byly pipetovány postupně z důvodu rychlého spuštění reakce po přidání frakce. Tvorba

produktu je sledována v sedmi cyklech po 1 minutě v oblasti lineárního růstu absorbance při vlnové délce 510 nm. K výpočtu byl použit molární extinkční koeficient produktu ($\epsilon = 5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Stanovení aktivity peroxidázy pomocí reakce guajakolu

Metoda měření je založena na principu přeměny guajakolu na žlutě zbarvený tetraguajakol v přítomnosti peroxidu vodíku (Drotar, et al., 1985).

Do všech jamek mikrotitrační destičky Greiner bylo napipetováno 10 μl biologické frakce. K frakci bylo multikanálovou pipetou přidáno 190 μl směsi pufr-substrát. Směs pufr-substrát obsahovala 27 ml 50 mM TRIS/HCl pufru o pH 6,00; 600 μl 3,4 mM guajakolu a 600 μl 9 mM H_2O_2 . Poté byla kineticky měřena změna absorbance 5 minut při vlnové délce 420 nm. Pro výpočet aktivity byl použit rozdíl absorbance ($\Delta A/\text{min}$) z oblasti lineárního nárůstu.

4.5.5 STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHIONPEROXIDÁZY

V průběhu reakce katalyzované GPX je GSH přeměňován na GSSG. Vzniklý oxidovaný glutathion je průběžně redukován glutathion-reduktázou. V průběhu reakce probíhá oxidace NADPH, což je monitorováno poklesem absorbance při 340 nm (Handy et al., 2009).

Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 μl frakce, kromě jamek, do kterých bylo napipetováno 50 μl pufru (sodno-fosfátový pufr o pH 7,4) jako slepého vzorku. Dále bylo do celé destičky multikanálovou pipetou přidáno 130 μl reakční směsi (10,8 ml 0,1 M draselno-fosfátového pufru pH=7,00; 1,2 ml 20 mM EDTA; 1,2 ml 10 U/ml GR; 2,4 ml 103 mM GSH). Po preinkubaci 10 minut při 25 °C v Thermomixeru bylo přidáno 10 μl NADPH (multikanálovou pipetou). Po dobu 5 minut byla sledována spotřeba NADPH nezávislá na hydroperoxidu. Reakce byla dále nastartována přidáním 10 μl 70% t-butyl hydroperoxidu. Pokles absorbance byl sledován po dobu 5 minut při 340 nm. Pro výpočet aktivity byl použit rozdíl absorbance ($\Delta A/\text{min}$) z oblasti lineárního poklesu.

4.5.6 STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHIONREDUKTÁZY

Metoda stanovení aktivity je založena na přeměně GSSG na redukováný GSH za současné oxidace NADPH (Carlberg & Mannervik, 1985).

Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 μ l biologické frakce, kromě jamek, kde byl slepý vzorek (sodno-fosfátový pufr o pH 7,4). Dále bylo do všech jamek přidáno 150 μ l reakční směsi (multikanálovou pipetou). Roztok Master mixu, určený na 1 destičku, obsahoval 6 ml 0,1 M K-fosfátového pufru o pH 7,00; 4,8 ml 5 mM EDTA; 6 ml 4 mM GSSG a 1,2 ml 2,5 mM NADPH. Pokles absorbance byl sledován po dobu 6 minut při vlnové délce 340 nm. Pro výpočet aktivity byl použitý rozdíl absorbance ($\Delta A/\text{min}$) z oblasti lineárního poklesu.

4.5.7 STANOVENÍ AKTIVITY GLUTATHION-S-TRANSFERÁZY

Princip měření aktivity GST je založen na tvorbě GSH-CDNB konjugátu, který má absorpční maximum při 340 nm (Ye, et al., 2001).

Aktivita GST byla měřená v Greiner mikrotitračních destičkách s plochým dnem. Do sedmi jamek v každém sloupci bylo napipetováno 6 μ l biologické frakce a do zbylé jamky bylo napipetováno 6 μ l pufru. Dále byla do všech jamek přidána multikanálovou pipetou reakční směs (roztok 4,5 ml 5,15 mM GSH; roztok 0,4 ml 51,5 mM CDNB; 15,6 ml 0,1 M sodno-fosfátového pufru pH 6,5). Množství reakční směsi odpovídá množství na jednu destičku. Destička se lehce protřepe a vloží do Tecanu. Přístroj měří absorbanci 6x v minutových intervalech při vlnové délce 340 nm. Pro výpočet aktivity byl použitý rozdíl absorbance ($\Delta A/\text{min}$) z oblasti lineárního vzestupu.

4.6 PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ PRO MĚŘENÍ ROSTLINNÝCH PIGMENTŮ

Dalším cílem práce bylo stanovení vybraných rostlinných barviv, které jsou důležitým ukazatelem stavu fotosyntetického aparátu rostlin.

Pro přípravu extraktů byly použity pouze listy rostlinných vzorků. Jednotlivé listy byly nastříhány na menší kousky, přendány do zkumavek Falcon a zváženy na analytických vahách. Následně byly k naváženým listům o hmotnosti 0,25 g přidány keramické kuličky a 10 ml 100% methanolu. Uzavřené zkumavky byly přendány do homogenizátoru MG Fast Prep (homogenizace 2x při 5,0 m/s po dobu 40 sekund). Dalším krokem bylo umístění zkumavek do třepačky, kde probíhala extrakce barviv po dobu 120 minut s následnou centrifugací (stočení při 500 g, 5 minut při 25 °C). Vzniklý extrakt byl odpipetován a připraven pro další použití.

4.6.1 MĚŘENÍ KONCENTRACE ROSTLINNÝCH PIGMENTŮ

Vzniklý extrakt ze zelených částí rostlin obsahuje fotosyntetické pigmenty (chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy). Tyto pigmenty mají v 100% methanolu dle Lichtenthalera et al., (1987) svá absorpční maxima při 665,2, 652,4 a 470 nm. Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) vybraných pigmentů byla vypočítána podle Lichtenthalerovy rovnice:

$$ca = 16,72 \cdot (A665,2) - 9,16 \cdot (A652,4)$$

$$cb = 34,09 \cdot (A652,4) - 15,28 \cdot (A665,2)$$

$$ca + b = 1,44 \cdot (A665,2) - 24,93 \cdot (A652,4)$$

$$cx + c = \frac{[1000 \cdot (A470) - 1,91 \cdot (ca) - 91,15 \cdot (cb)]}{225}$$

ca – koncentrace chlorofylu a, cb – koncentrace chlorofylu b, ca+b – koncentrace chlorofylu a+b, cx+c – koncentrace karotenoidů, A – absorbance příslušná dané vlnové délce

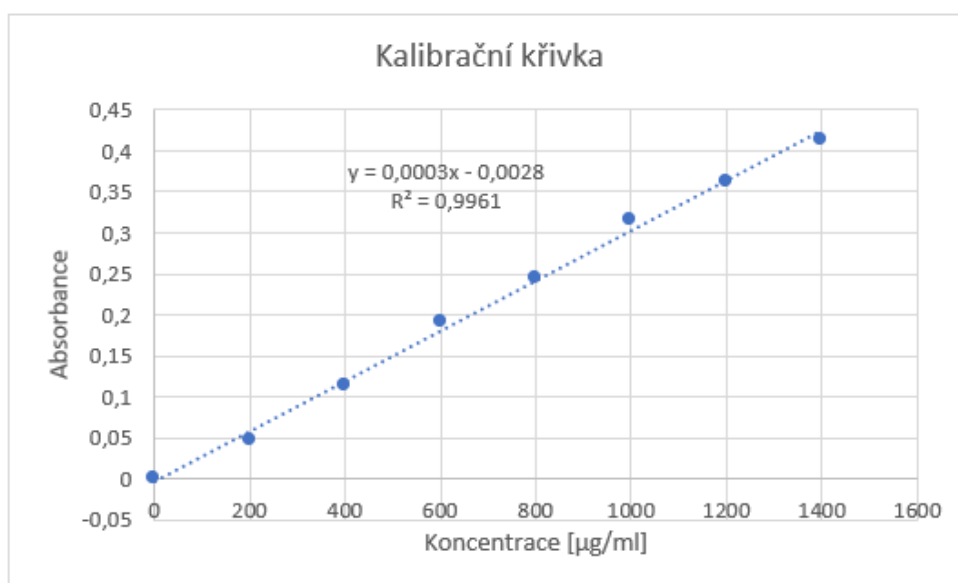
Extrakt byl napipetovaný do čirých křemenných kyvet a umístěn do spektrofotometru, jako slepý vzorek byl použitý 100% methanol. Každý vzorek byl změřen pomocí spektrofotometru Cecil při třech vlnových délkách uvedených v předchozím odstavci. Zaznamenaná absorbance byla přepočítána z mg/ml na mg/g čerstvých listů jetele lučního.

5. VÝSLEDKY

Jednotlivé získané výsledky byly rozděleny do dvou částí. V 1. části jsou uvedeny výsledky sběru rostlin jetele za rok 2019. Ve 2. části proběhl sběr jetele v roce 2020.

5.1 STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN - ČÁST 1.

Množství bílkovin naměřených ve vzorcích jetele lučního ovlivněných ABZ a v kontrolních vzorcích za rok 2019.



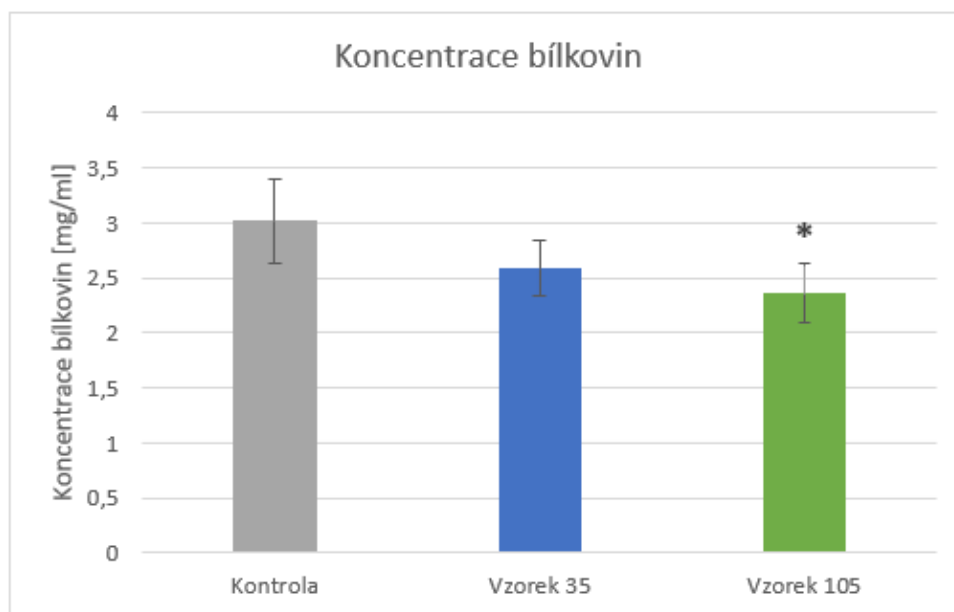
Obrázek 11 Závislost absorbance na koncentraci bílkovin. Hodnoty absorbance jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření

Pro měření koncentrace proteinů byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 11), která se skládá z hodnot naměřených absorbancí, které jsou příslušné koncentracím koncentrační řady BSA. Koncentrační řada byla měřena ve třech na sobě nezávislých měřeních. Body, které byly vyneseny v grafu, byly proloženy lineární spojnicí trendu. Z rovnice lineární regrese kalibrační křivky byly dopočítány koncentrace bílkovin v listech rostlinných vzorků. Stanovená koncentrace bílkovin byla použita pro výpočet specifické aktivity enzymů. Koncentrace bílkovin rostlinných vzorků jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4 Koncentrace bílkovin v jetelu

	Koncentrace [mg/ml]	p-value
Kontrola	3,02 ± 0,38	-
Vzorek 35	2,58 ± 0,25	0,14
Vzorek 105	2,36 ± 0,26*	0,01

* Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



Obrázek 12 Porovnání koncentrace bílkovin ve vzorcích jetele lučního. Hodnoty koncentrace bílkoviny jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,05$) oproti kontrolní skupině je značena jako *

Na Obrázku 12 je možné vidět signifikantní pokles koncentrace bílkoviny pouze u vzorku 105 oproti kontrole. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 4.

5.2 AKTIVITA ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ ČÁST 1.

Porovnání specifických aktivit vybraných antioxidačních enzymů v roce 2019 u kontrolních (Kontrola) a ABZ ovlivněných (Vzorek 35, Vzorek 105) rostlin jetele.

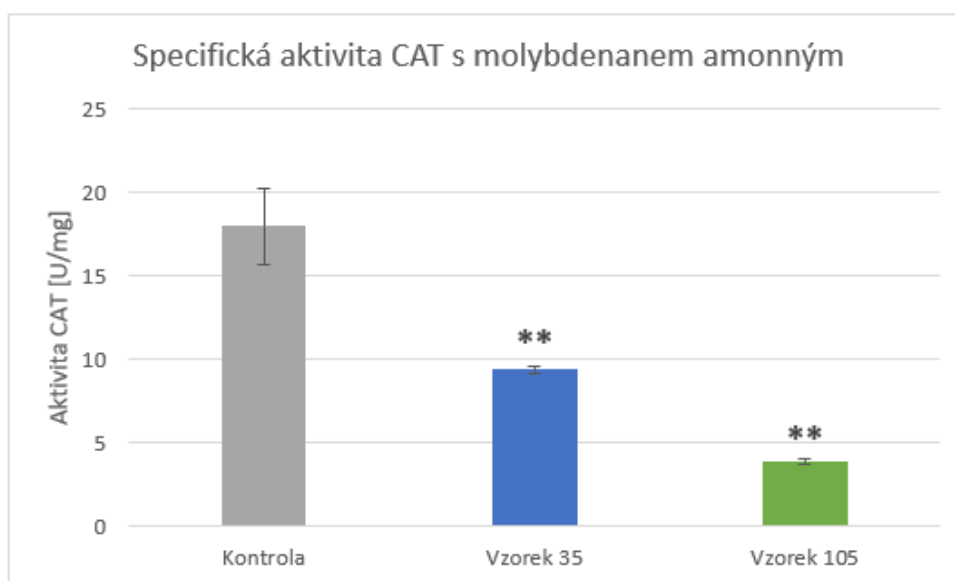
5.2.1 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY KATALÁZY ABZ

Specifická aktivita katalázy (CAT) v jeteli byla stanovena dvěma metodami. V této kapitole jsou uvedeny výsledky získané stanovením aktivity pomocí reakce molybdenanu amonného (Tab. 5) a pomocí reakce s peroxidem vodíku (Tab. 6).

Tabulka 5 Specifická aktivita CAT v kontrolních a ABZ ovlivněných vzorcích jetele stanovená pomocí reakce molybdenanu amonného

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	17,97 ± 2,24	-
Vzorek 35	9,39 ± 0,26**	0,001
Vzorek 105	3,87 ± 0,18**	0,001

** Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



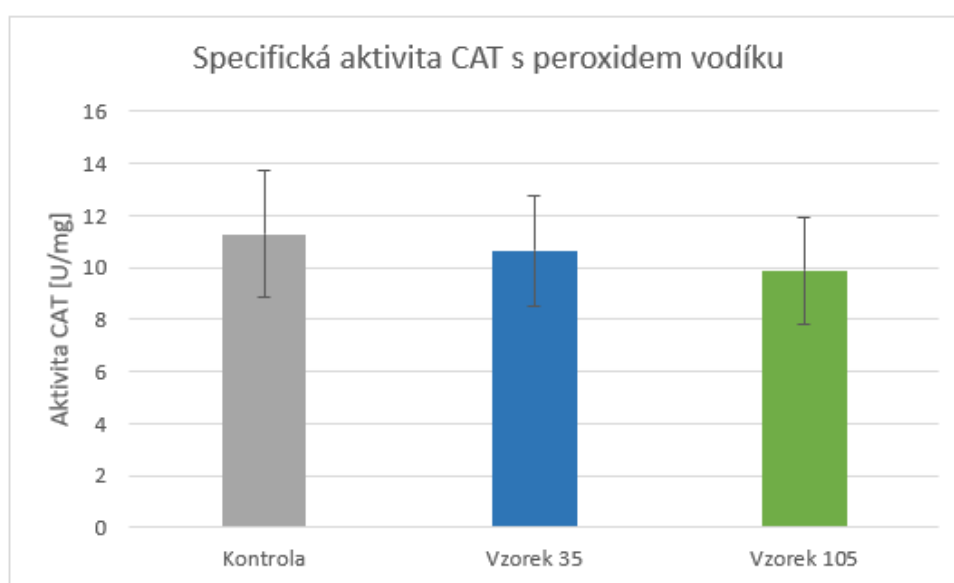
Obrázek 13 Porovnání specifické aktivity CAT v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině je značena jako **

Na Obrázku 13 je možné vidět signifikantní pokles specifické aktivity enzymu CAT jak u vzorku 35, tak u vzorku 105. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst

či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 6 Specifická aktivita CAT v kontrolních a ABZ ovlivněných vzorcích jetele stanovená pomocí reakce s peroxidem vodíku

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	11,28 ± 2,42	-
Vzorek 35	10,65 ± 2,12	0,54
Vzorek 105	9,89 ± 2,05	0,18



Obrázek 14 Porovnání specifické aktivity CAT v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření

Z Obrázku 14 je možné vyčíst, že u vzorku 35 ani 105 není zaznamenán signifikantní nárůst ani signifikantní pokles specifické aktivity enzymu CAT. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 5.

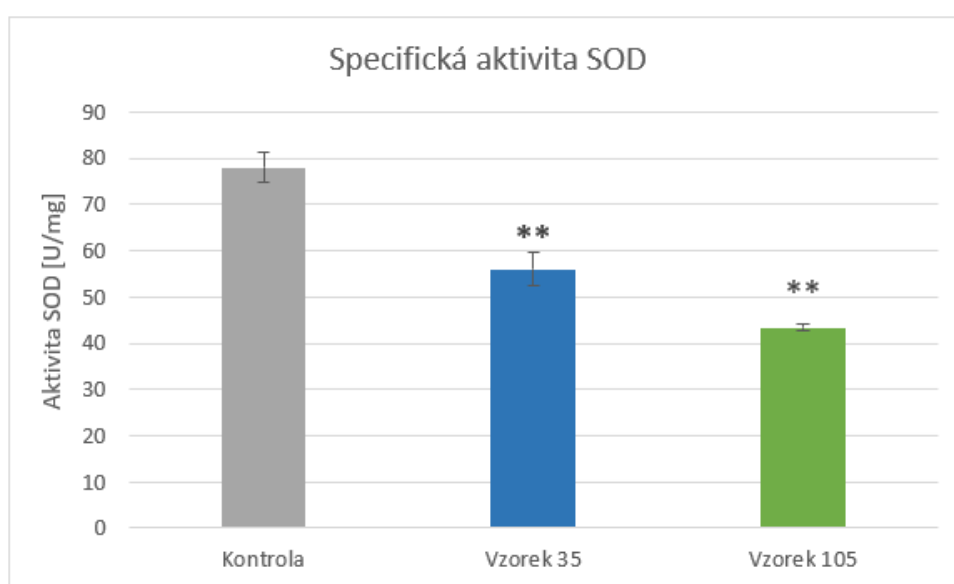
5.2.2 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY SUPEROXIDDISMUTÁZY ABZ

Aktivita SOD byla stanovena ve vzorcích rostlin podle metody uvedené v kapitole 4.5.2. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 Specifická aktivita SOD v kontrolních a ABZ ovlivněných vzorcích jetele

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	78,02 ± 3,09	-
Vzorek 35	56,01 ± 3,63**	0,001
Vzorek 105	43,32 ± 0,72**	0,001

** Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



Obrázek 15 Porovnání specifické aktivity SOD v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině je značena jako **

Na Obrázku 15 je možné pozorovat signifikantní pokles specifické aktivity enzymu SOD jak u vzorku 35, tak u vzorku 105. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 7.

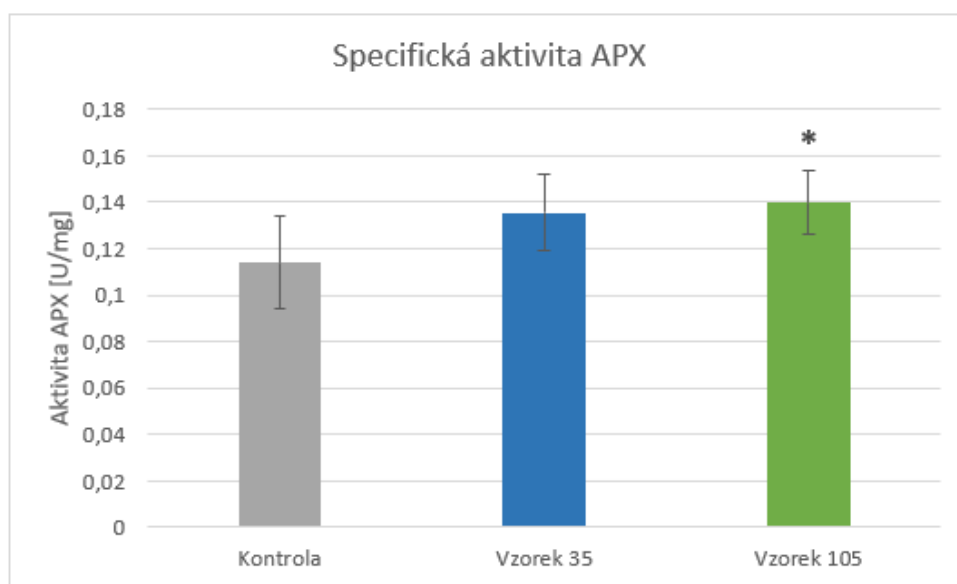
5.2.3 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY ASKORBÁTPEROXIDÁZY ABZ

Aktivita APX byla stanovena ve vzorcích rostlin podle metody uvedené v kapitole 4.5.3. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8 Specifická aktivita APX v kontrolních a ABZ ovlivněných vzorcích jetele

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	0,11 ± 0,02	-
Vzorek 35	0,13 ± 0,02	0,06
Vzorek 105	0,14 ± 0,01*	0,03

* Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



Obrázek 16 Porovnání specifické aktivity APX v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,05$) oproti kontrolní skupině je značena jako *

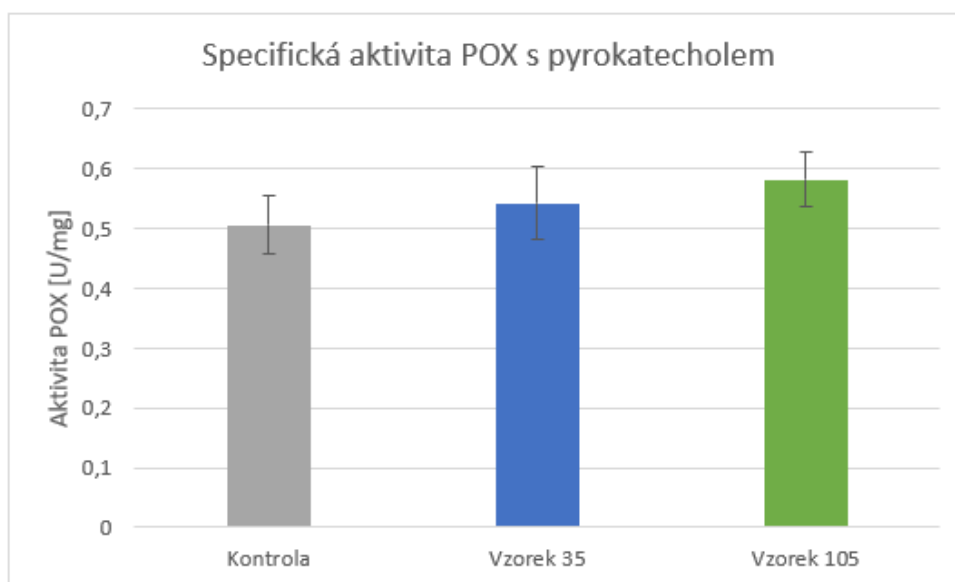
Na Obrázku 16 je možno vidět signifikantní nárůst specifické aktivity enzymu APX u vzorku 105. U vzorku 35 není zaznamenán signifikantní nárůst ani pokles specifické aktivity. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 8.

5.2.4 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY PEROXIDÁZY ABZ

Specifická aktivita peroxidázy (POX) v jeteli byla stanovena dvěma metodami. V této kapitole jsou uvedeny výsledky získané stanovením aktivity pomocí reakce pyrokatecholu (Tab. 9) a pomocí reakce guajakolu (Tab. 10).

Tabulka 9 Specifická aktivita POX v kontrolních a ABZ ovlivněných vzorcích jetele stanovená pomocí reakce pyrokatecholu

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	0,51 ± 0,05	-
Vzorek 35	0,54 ± 0,06	0,79
Vzorek 105	0,58 ± 0,05	0,57



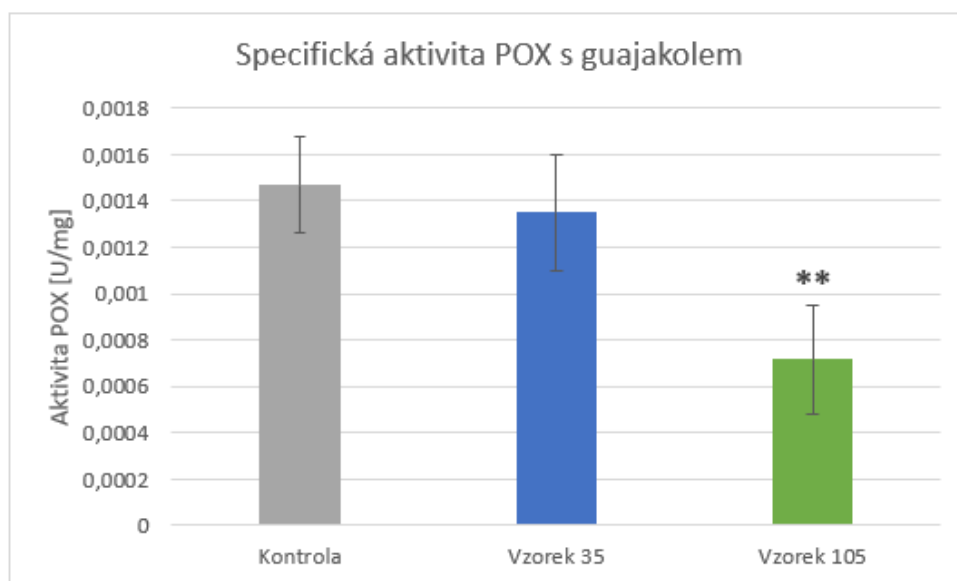
Obrázek 17 Porovnání specifické aktivity POX v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření

Z Obrázku 17 je možné vyčíst, že u vzorku 35 ani 105 není zaznamenán signifikantní nárůst ani signifikantní pokles specifické aktivity enzymu POX. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 10 Specifická aktivita POX v kontrolních a ABZ ovlivněných vzorcích jetele pomocí reakce guajakolu

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	0,0015 ± 0,0002	-
Vzorek 35	0,0014 ± 0,0002	0,485
Vzorek 105	0,0007 ± 0,0002**	0,001

** Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



Obrázek 18 Porovnání specifické aktivity POX v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině je značena jako **

Na Obrázku 18 je možné vidět signifikantní pokles specifické aktivity enzymu POX u vzorku 105. U vzorku 35 není zaznamenán signifikantní nárůst ani pokles specifické aktivity. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 18.

5.2.5 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHIONPEROXIDÁZY ABZ

Aktivita GPX byla stanovena ve vzorcích rostlin podle metody uvedené v kapitole 4.5.5. Aktivitu enzymu GPX nebylo možné v rostlinných subcelulárních frakcích stanovit z důvodu negativních hodnot rozdílů absorbance. Pro ověření správnosti metody byl enzym GPX přeměřen v cytosolu potkana, kde byly hodnoty rozdílů absorbance pozitivní. Metodu tedy lze považovat za správně provedenou.

5.2.6 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHIONREDUKTÁZY ABZ

Aktivita GR byla stanovena ve vzorcích rostlin podle metody uvedené v kapitole 4.5.6. Aktivitu enzymu GR nebylo možné stanovit z důvodu nelineárního poklesu absorbance v rostlinných subcelulárních frakcích. Pro ověření správnosti metody byl enzym GR přeměřen v cytosolu potkana, kde byl pokles absorbance lineární. Metodu tedy lze považovat za správně provedenou.

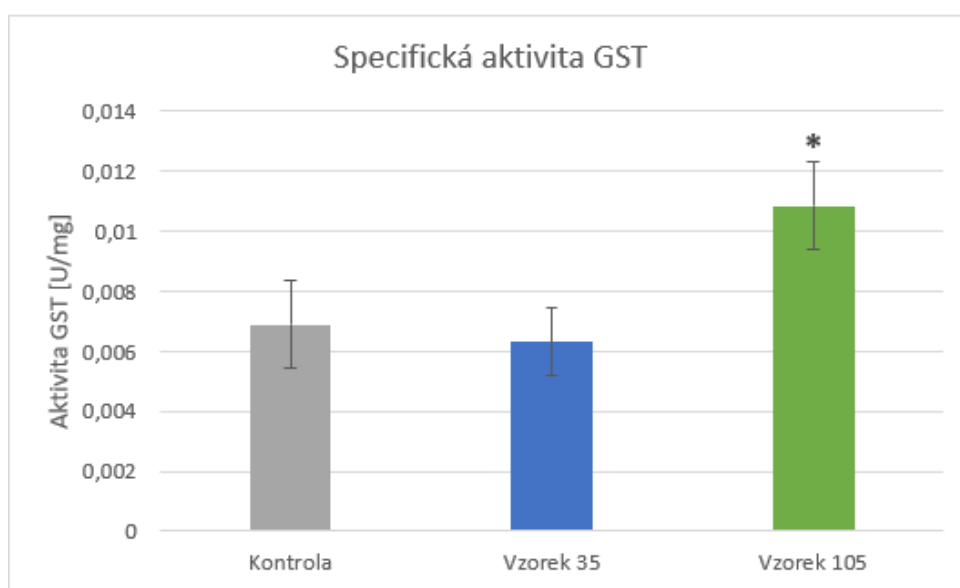
5.2.7 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHION-S-TRANSFERÁZY ABZ

Aktivita GST byla stanovena ve vzorcích kontrolních i ABZ ovlivněných rostlin podle metody uvedené v kapitole 4.5.7. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 11.

Tabulka 11 Specifická aktivita GST v kontrolních a ABZ ovlivněných vzorcích jetele

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	0,007 ± 0,001	-
Vzorek 35	0,006 ± 0,001	0,170
Vzorek 105	0,011 ± 0,001*	0,003

* Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům

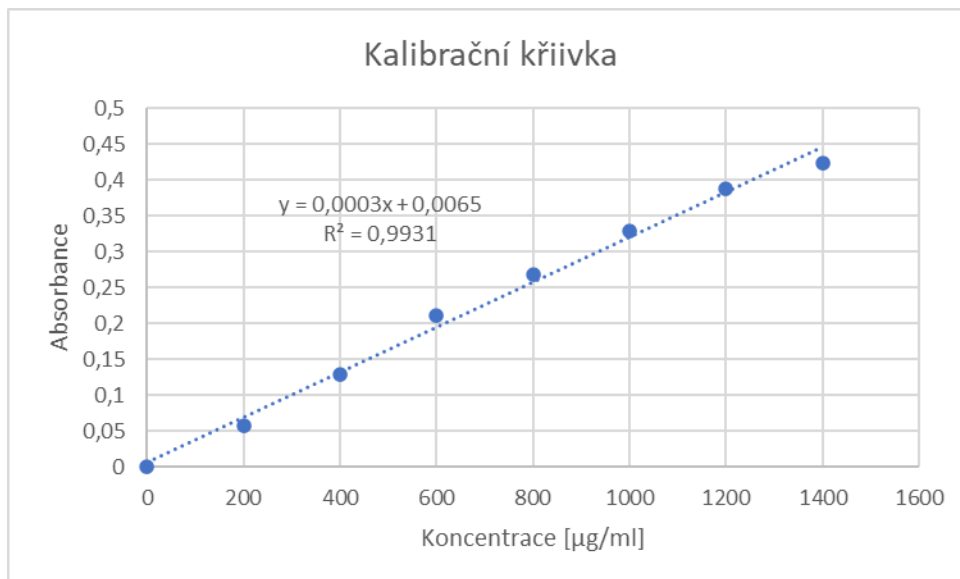


Obrázek 19 Porovnání specifické aktivity GST v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,05$) oproti kontrolní skupině je značena jako *

Na Obrázku 19 je možno vidět signifikantní nárůst specifické aktivity enzymu GST u vzorku 105. U vzorku 35 není zaznamenán signifikantní nárůst ani pokles specifické aktivity. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 11.

5.3 STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN – ČÁST 2.

Množství bílkovin naměřených ve vzorcích jetele lučního ovlivněných ABZ a v kontrolních vzorcích za rok 2020.



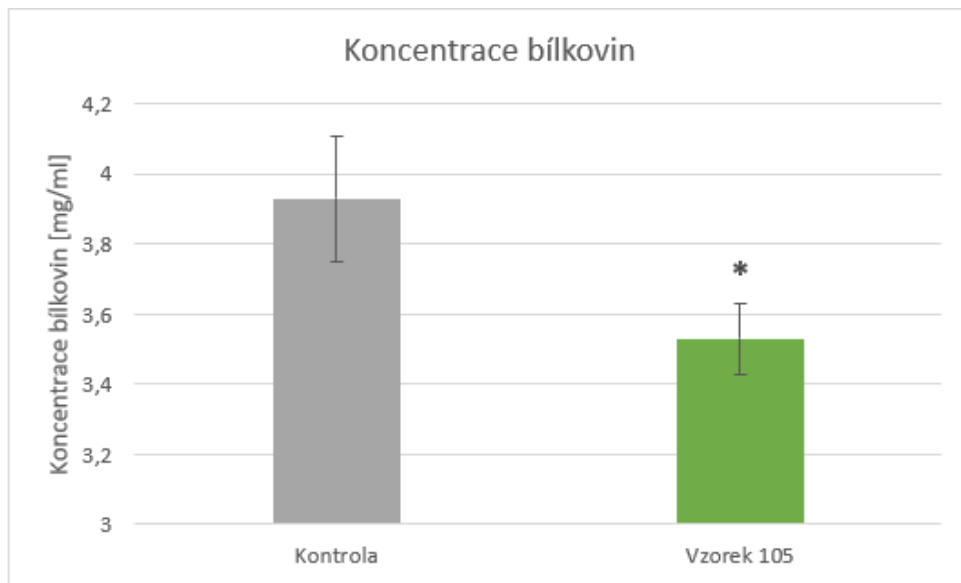
Obrázek 20 Závislost absorbance na koncentraci bílkovin. Hodnoty absorbance jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,05$) oproti kontrolní skupině je značena jako *

Pro měření koncentrace proteinů byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 20), která se skládá z hodnot naměřených absorbancí, které jsou příslušné koncentracím koncentrační řady BSA. Koncentrační řada byla měřena v třech na sobě nezávislých měřeních. Body, které byly vyneseny v grafu byly proloženy lineární spojnici trendu. Z rovnice lineární regrese kalibrační křivky byly dopočítány koncentrace bílkovin v listech rostlinných vzorků. Stanovená koncentrace bílkovin byla použita pro výpočet specifické aktivity enzymů. Koncentrace bílkovin rostlinných vzorků jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12 Koncentrace bílkovin v jetelu

	Koncentrace [mg/ml]	p-value
Kontrola	$3,93 \pm 0,18$	-
Vzorek 105	$3,53 \pm 0,10^*$	0,01

* Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



Obrázek 21 Porovnání koncentrace bílkovin ve vzorcích jetele lučního. Hodnoty koncentrace bílkoviny jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,05$) oproti kontrolní skupině je značena jako *

Na Obrázku 21 je možné vidět signifikantní pokles koncentrace bílkoviny u vzorku 105 oproti kontrole. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 12.

5.4 AKTIVITA ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ – ČÁST 2.

Porovnání specifických aktivit vybraných antioxidačních enzymů v roce 2020 u kontrolních (Kontrola) a ABZ ovlivněných (Vzorek 105) rostlin jetele.

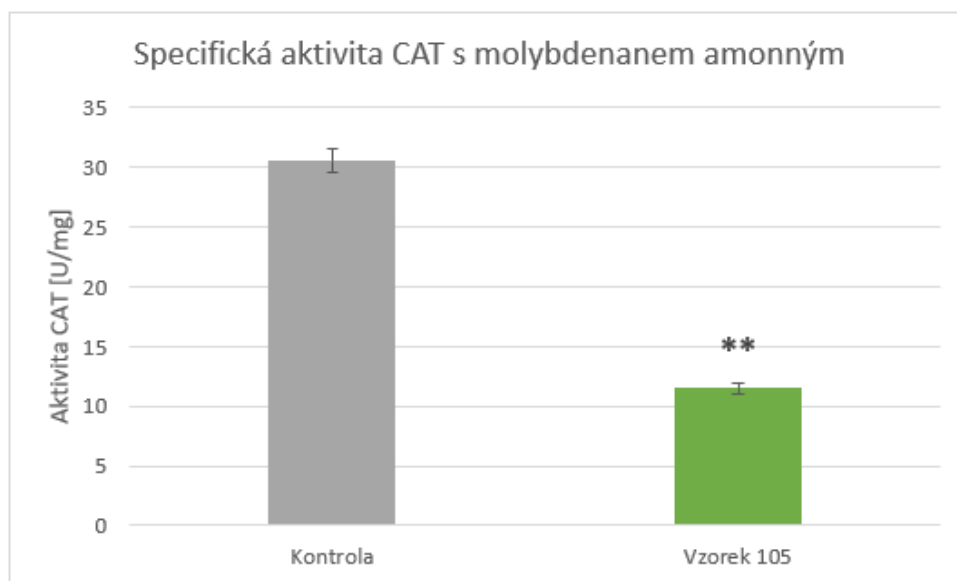
5.4.1 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY KATALÁZY ABZ

Specifická aktivita katalázy (CAT) v jeteli byla stanovena dvěma metodami. V této kapitole jsou uvedeny výsledky získané stanovením aktivity pomocí reakce molybdenanu amonného (Tab. 13) a pomocí reakce s peroxidem vodíku (Tab. 14).

Tabulka 13 Specifická aktivita CAT v kontrolních a ABZ ovlivněných vzorcích jetele stanovená pomocí reakce molybdenanu amonného

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	30,52 ± 0,96	-
Vzorek 105	11,48 ± 0,45**	<0,0001

** Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



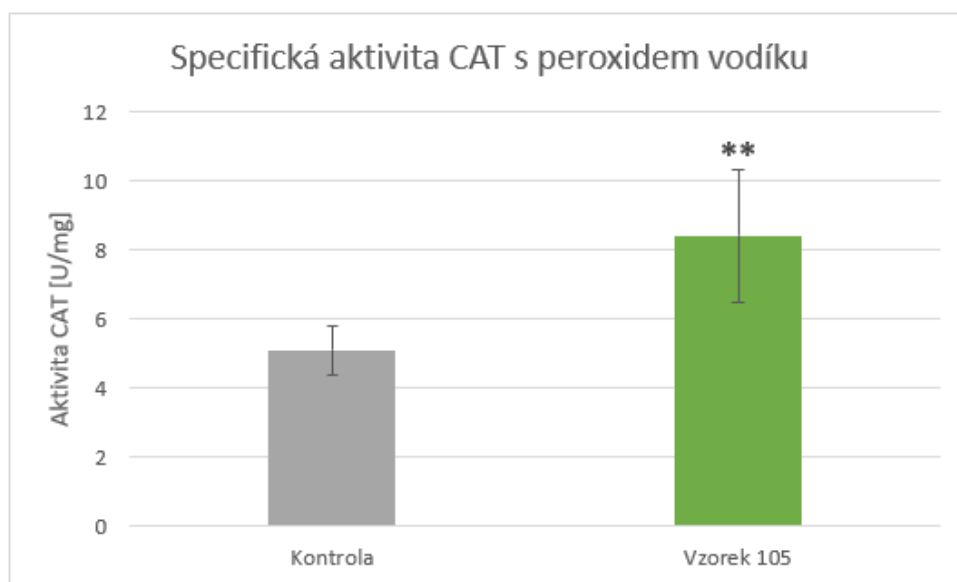
Obrázek 22 Porovnání specifické aktivity CAT v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině je značena jako **

Na Obrázku 22 je možné vidět signifikantní pokles specifické aktivity enzymu CAT. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 14 Specifická aktivita CAT v kontrolních a ABZ ovlivněných vzorcích jetele stanovená pomocí reakce peroxidu vodíku

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	5,10 ± 0,71	-
Vzorek 105	8,41 ± 1,91**	0,004

** Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



Obrázek 23 Porovnání specifické aktivity CAT v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině je značena jako **

Na Obrázku 23 je možné vidět signifikantní vzrůst specifické aktivity enzymu CAT oproti kontrole. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 14.

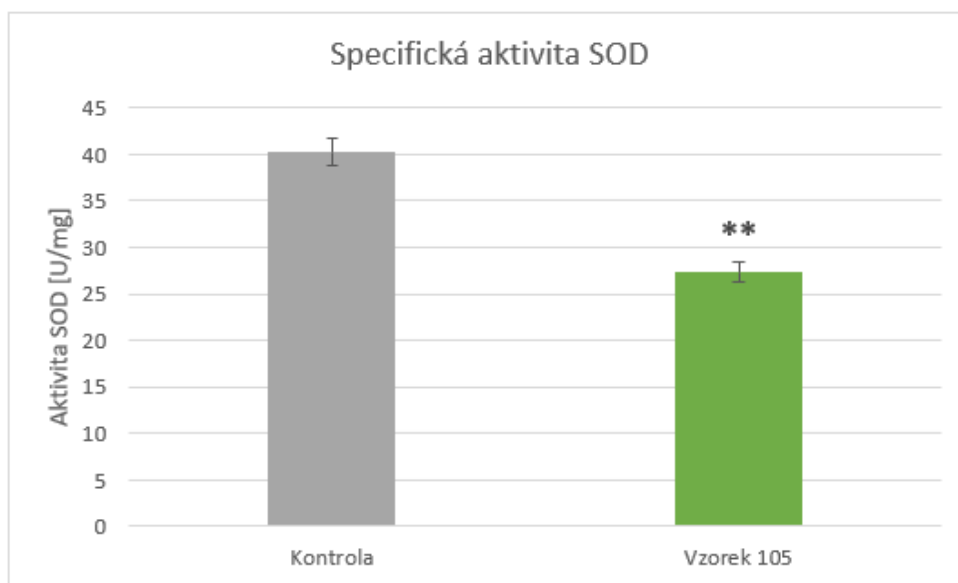
5.4.2 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY SUPEROXIDDISMUTÁZY ABZ

Aktivita SOD byla stanovena ve vzorcích rostlin podle metody uvedené v kapitole 4.5.2. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15 Specifická aktivita SOD a ABZ ovlivněných vzorcích jetele

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	40,27 ± 1,56	-
Vzorek 105	27,30 ± 1,05**	0,0008

** Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



Obrázek 24 Porovnání specifické aktivity SOD v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině je značena jako **

Na Obrázku 24 je možné vidět signifikantní pokles specifické aktivity enzymu SOD. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 24.

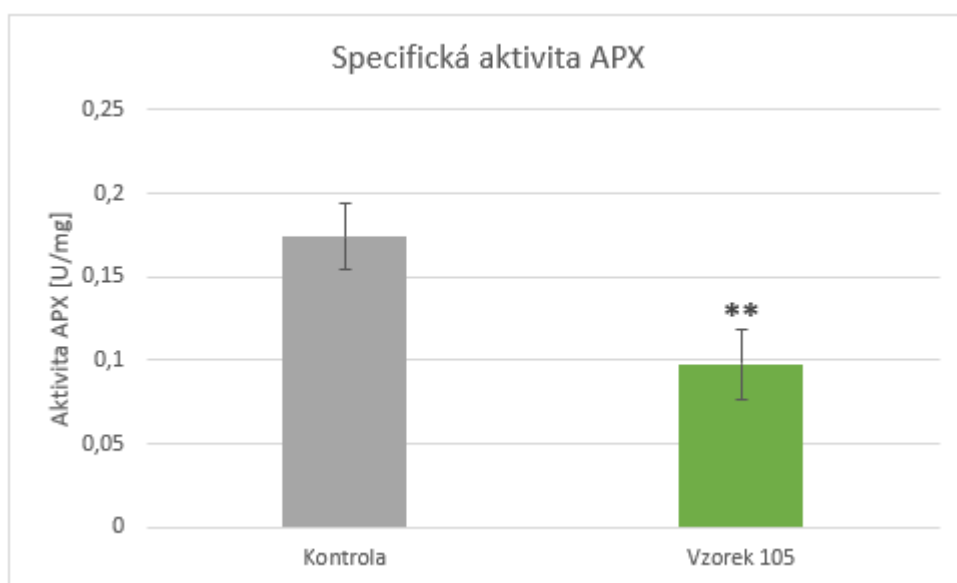
5.4.3 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY ASKORBÁTPEROXIDÁZY ABZ

Aktivita APX byla stanovena ve vzorcích rostlin podle metody uvedené v kapitole 4.5.3. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 16.

Tabulka 16 Specifická aktivita APX a ABZ ovlivněných vzorcích jetele

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	0,17 ± 0,01	-
Vzorek 105	0,10 ± 0,02**	0,0004

**Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



Obrázek 25 Porovnání specifické aktivity APX v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině je značena jako **

Na Obrázku 25 je možné vidět signifikantní pokles specifické aktivity enzymu APX oproti kontrole. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 16.

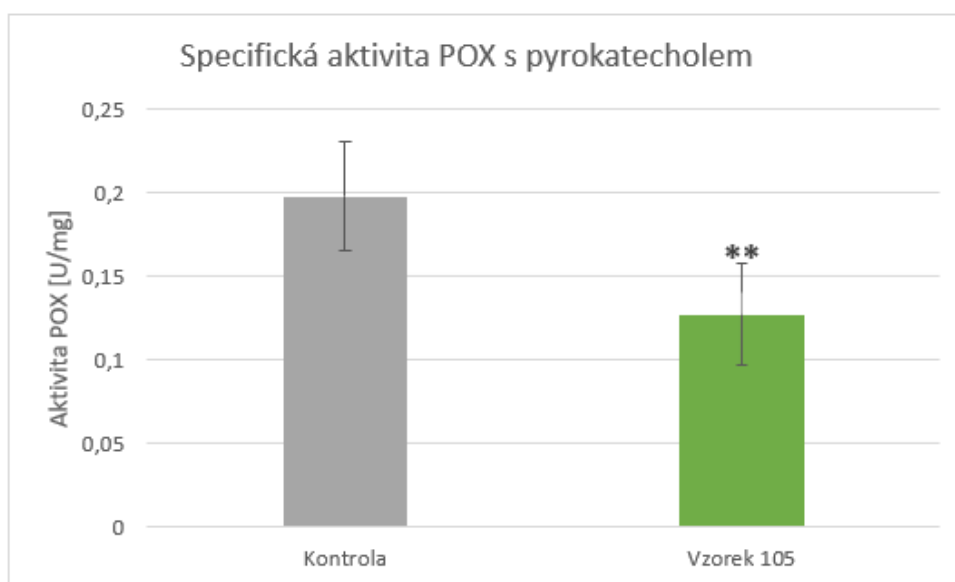
5.4.4 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY PEROXIDÁZY ABZ

Specifická aktivita peroxidázy (POX) v jeteli byla stanovena dvěma metodami. V této kapitole jsou uvedeny výsledky získané stanovením aktivity pomocí reakce pyrokatecholu (Tab. 17) a získané stanovením aktivity pomocí reakce guajakolu (Tab. 18).

Tabulka 17 Specifická aktivita POX v kontrolních a ABZ ovlivněných vzorcích jetele stanovená pomocí reakce pyrokatecholu

	Specifická aktivita [U/mg]	P-hodnota
Kontrola	0,20 ± 0,03	-
Vzorek 105	0,13 ± 0,03**	0,003

** Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



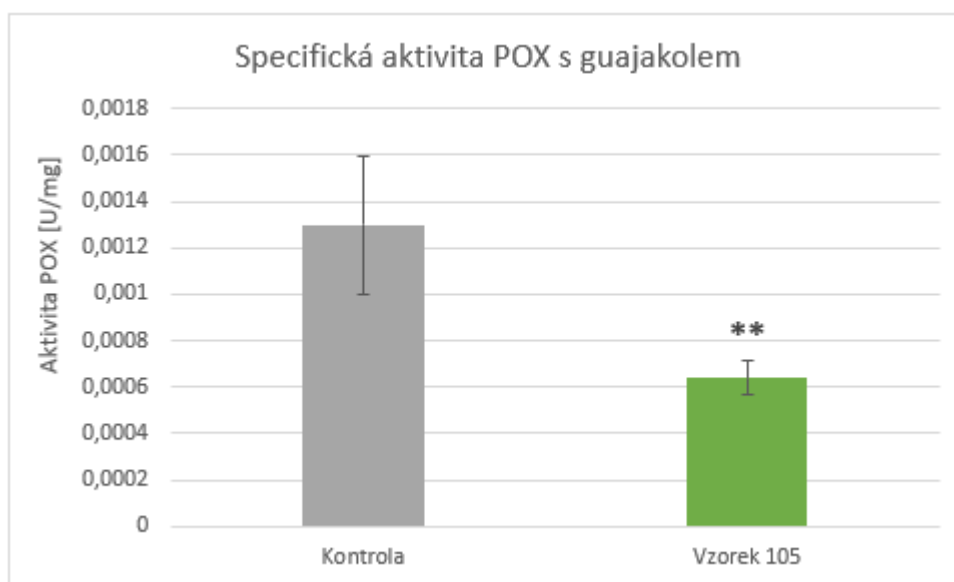
Obrázek 26 Porovnání specifické aktivity POX v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině je značena jako **

Na Obrázku 26 je možné vidět signifikantní pokles specifické aktivity enzymu POX. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 17.

Tabulka 18 Specifická aktivita POX v kontrolních a ABZ ovlivněných vzorcích jetele stanovená pomocí reakce guajakolu

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	0,0013 ± 0,0003	-
Vzorek 105	0,0006 ± 7,51298E-05**	0,007

** Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



Obrázek 27 Porovnání specifické aktivity POX v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině je značena jako **

Na Obrázku 27 můžeme vidět signifikantní pokles specifické aktivity enzymu POX. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 18.

5.4.5 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHIONPEROXIDÁZY ABZ

Aktivita GPX byla stanovena ve vzorcích rostlin podle metody uvedené v kapitole 4.5.5. Aktivitu enzymu GPX nebylo možné určit ani u 2. části měření. Opakovala se stejná situace jako u 1. části výsledků viz kapitola 5.2.7.

5.4.6 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHIONREDUKTÁZY ABZ

Aktivita GR byla stanovena ve vzorcích rostlin podle metody uvedené v kapitole 4.5.6. Aktivitu enzymu GR nebylo možné určit ani u 2. části měření. Opakovala se stejná situace jako u 1. části výsledků viz kapitola 5.2.8.

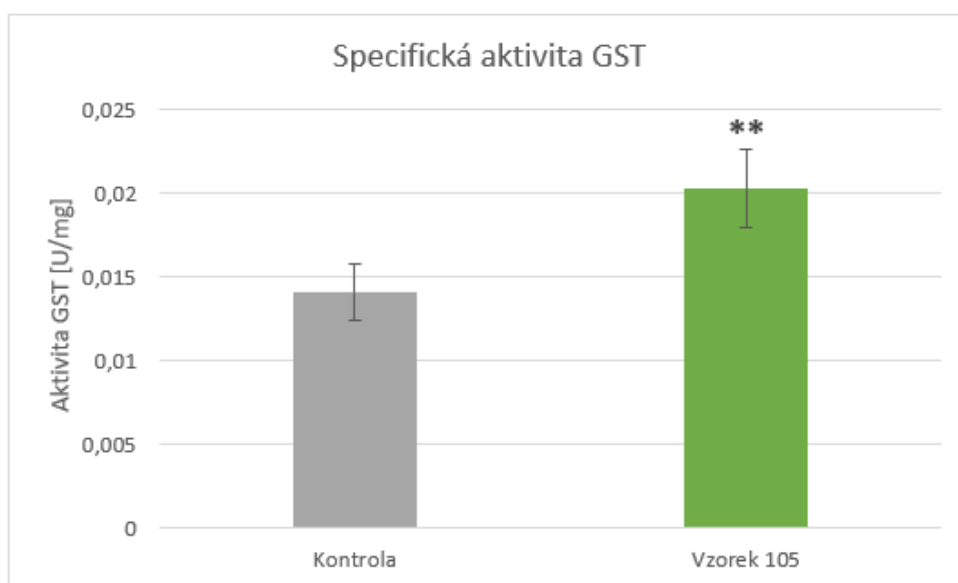
5.4.7 OVLIVNĚNÍ AKTIVITY GLUTATHION-S-TRANSFERÁZY ABZ

Aktivita GST byla stanovena ve vzorcích rostlin podle metody uvedené v kapitole 4.5.7. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 19.

Tabulka 19 Specifická aktivita GST a ABZ ovlivněných vzorcích jetele

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola	0,01 ± 0,002	-
Vzorek 105	0,02 ± 0,002**	<0,0001

** Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



Obrázek 28 Porovnání specifické aktivity GST v jednotlivých vzorcích kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin. Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině je značena jako **

Na Obrázku 25 je možné vidět signifikantní vzrůst specifické aktivity enzymu GST. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 19.

5.5 SPECIFICKÉ AKTIVITY ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ KONTROLNÍCH ROSTLIN JETELE V ROCE 2019 A 2020

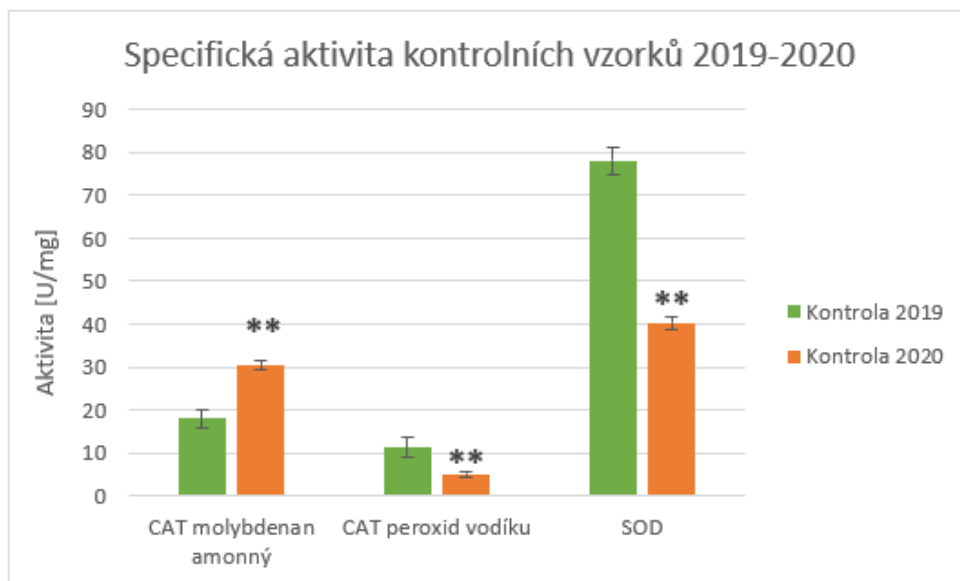
Kromě studia vlivu ABZ na antioxidační enzymy jetele (porovnání aktivity enzymů u vzorků kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin) byly také mezi sebou porovnávány aktivity těchto enzymů u kontrolních rostlin z jednotlivých měření. Kontrola 2019 představuje vzorky rostlin sklizené v roce 2019. Kontrola 2020 představuje vzorky rostlin sklizené v roce 2020. Přehled jednotlivých specifických aktivit je uveden v Tabulce 20.

Tabulka 20 Specifická aktivita antioxidačních enzymů v kontrolních vzorcích jetele sklizeného v roce 2019 a 2020

	Specifická aktivita [U/mg]	p-value
Kontrola 2019 CAT molybdenan amonný	17,97 ± 2,25	0,0008
Kontrola 2020 CAT molybdenan amonný	30,52 ± 0,96**	0,0008
Kontrola 2019 CAT peroxid vodíku	11,28 ± 2,42	0,006
Kontrola 2020 CAT peroxid vodíku	5,10 ± 0,71**	0,006
Kontrola 2019 SOD	78,02 ± 3,09	0,0001
Kontrola 2020 SOD	40,27 ± 1,56**	0,0001
Kontrola 2019 APX	0,11 ± 0,02	0,0001
Kontrola 2020 APX	0,17 ± 0,02**	0,0001
Kontrola 2019 POX pyrokatechol	0,51 ± 0,05	0,05
Kontrola 2020 POX pyrokatechol	0,20 ± 0,03*	0,05
Kontrola 2019 POX guajakol	0,002 ± 0,0002	0,15
Kontrola 2020 POX guajakol	0,001 ± 0,0003	0,15
Kontrola 2019 GST	0,007 ± 0,001	0,0001
Kontrola 2020 GST	0,014 ± 0,002**	0,0001

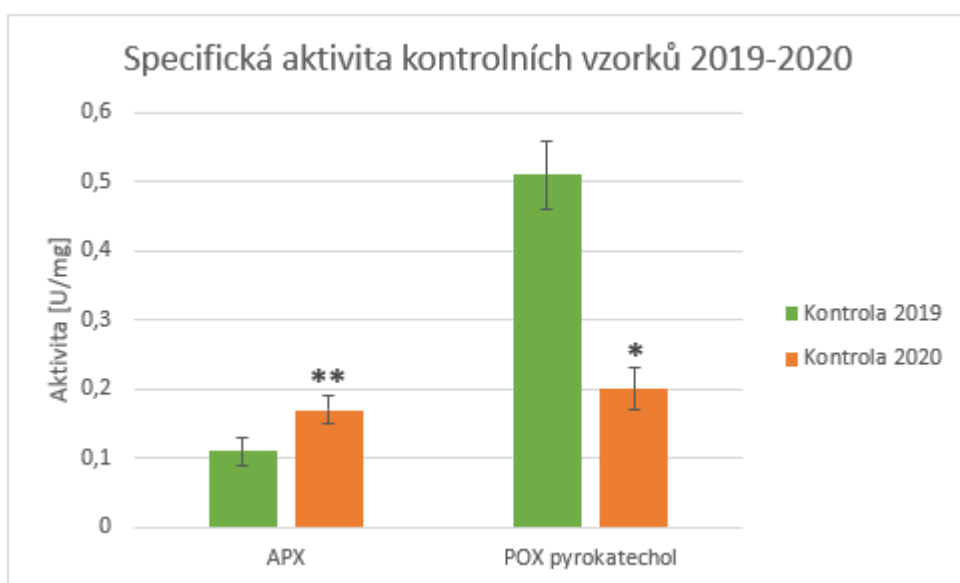
*Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) ve vzorcích z roku 2020 oproti vzorkům z roku 2019

**Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) ve vzorcích z roku 2020 oproti vzorkům z roku 2019



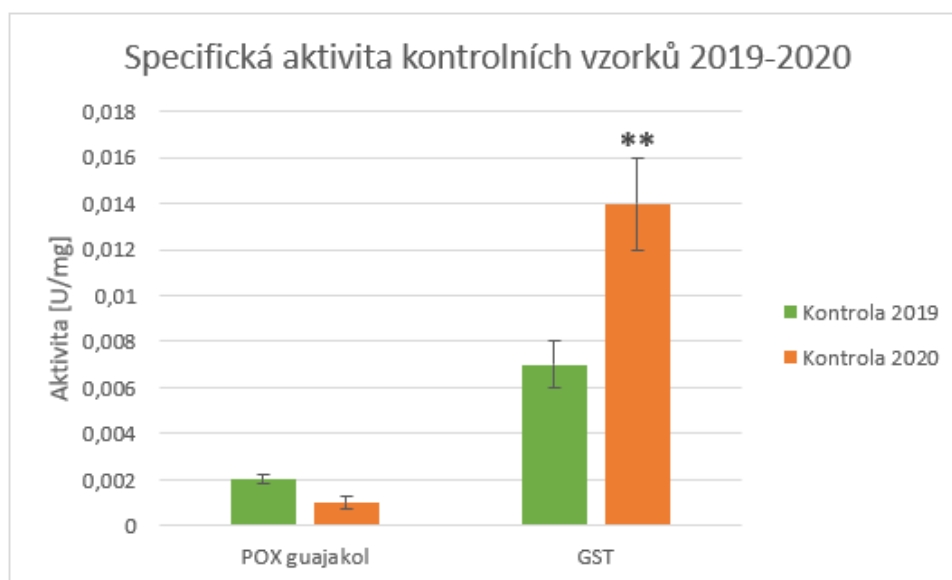
Obrázek 29 Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) je značena jako **

Na Obrázku 29 je možné vidět signifikantní pokles kontrol 2020 oproti kontrolám 2019 u enzymů CAT s peroxidem vodíku a SOD. Vzrůst aktivity kontroly 2020 oproti kontrole 2019 je možné vidět u CAT s molybdenanem amonným. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 20.



Obrázek 30 Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) je značena jako **. Signifikantní změna ($p < 0,05$) je značena jako *

Na Obrázku 30 je možné vidět signifikantní pokles kontrol 2020 oproti kontrolám 2019 u enzymu POX s pyrokatecholem. Vzrůst aktivity kontroly 2020 oproti kontrole 2019 je možné u enzymu APX. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 20.



Obrázek 31 Hodnoty specifické aktivity enzymu jsou vyjádřené jako aritmetické průměry ze 3 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině je značena jako **

Na Obrázku 31 je možné vidět, že nenastal signifikantní nárůst ani pokles aktivity kontroly 2020 oproti kontrole 2019 u enzymu POX s guajakolem. V případě GST došlo k signifikantnímu vzrůstu aktivity u kontroly 2020 oproti kontrole 2019. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 20.

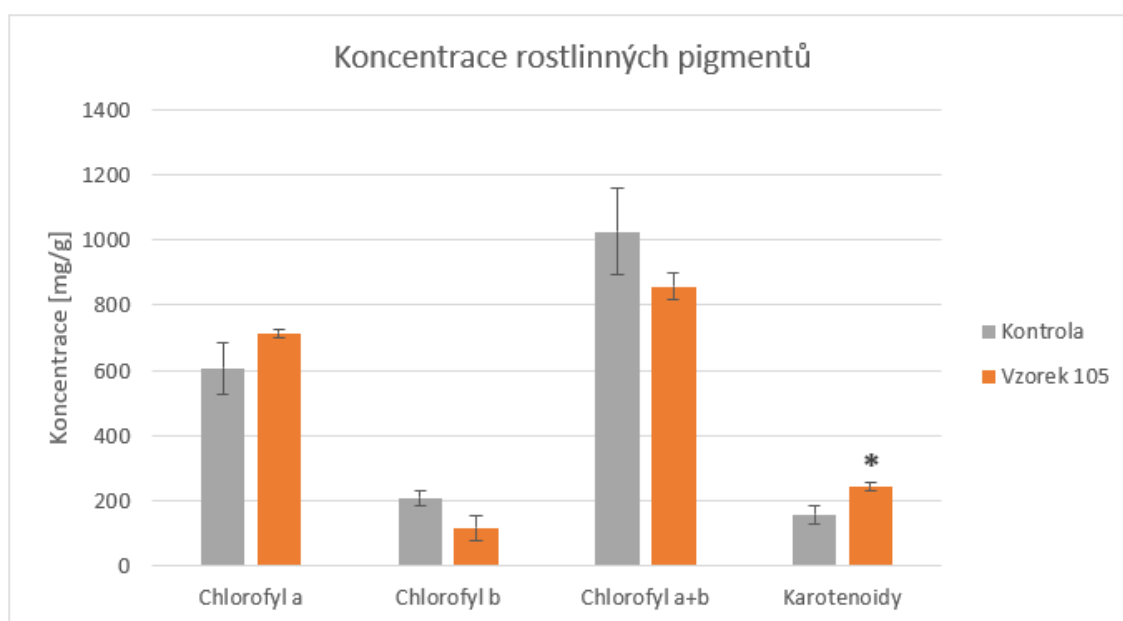
5.5.1 OVLIVNĚNÍ KONCENTRACE ROSTLINNÝCH PIGMENTŮ ABZ

Koncentrace rostlinných pigmentů byla stanovena v listech jetele sklizeného v roce 2020. Fotosyntetické pigmenty byly extrahovány do metanolu (kapitola 4.6) a v extraktu pak byla změřena jejich absorbance (Tab. 21).

Tabulka 21 Koncentrace chlorofylů a karotenoidů v listech kontrolních a ABZ ovlivněných rostlin jetele

	Kontrola koncentrace [mg/g]	Vzorek 105 koncentrace [mg/g]	p-value
Chlorofyl <i>a</i>	606,77 ± 79,13	715,01 ± 12,39	0,37
Chlorofyl <i>b</i>	210,20 ± 22,92	117,19 ± 39,88	0,45
Chlorofyl <i>a/b</i>	1025,13 ± 132,04	857,16 ± 40,58	0,21
Karotenoidy	157,74 ± 28,06	243,12 ± 12,05*	0,04

* Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) ve vzorcích ovlivněných oproti kontrolním vzorkům



Obrázek 32 Porovnání koncentrací chlorofylů a karotenoidů ve vzorcích. Hodnoty koncentrací jsou vyjádřené jako aritmetické průměry z 5 nezávislých měření. Signifikantní změna ($p < 0,05$) je označena jako *

Z Obrázku 32 je možné vyčíst, že u chlorofylu *a*, *b* a *a/b* není zaznamenán signifikantní nárůst či signifikantní pokles koncentrace pigmentů. Naopak u karotenoidů je možné vidět signifikantní nárůst hodnot oproti kontrolnímu vzorku. K určení, zda se jedná o signifikantní nárůst či pokles slouží hodnota p-value. Tato hodnota byla získána nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Naměřené hodnoty p-value jsou uvedeny v Tabulce 21.

6. DISKUZE

Veterinární léčiva jako kontaminanty životního prostředí se až v současné době stávají čím dál větším předmětem zájmu i přesto, že jsou v životním prostředí přítomna již delší dobu. Ve velké míře se používají k léčbě a prevenci chorob hospodářských zvířat. Do životního prostředí mohou léčiva vstupovat z ošetřených zvířat, nevhodným skladováním nebo nevhodnou likvidací. Tímto může vznikat nebezpečí pro různé organismy, včetně rostlin. Rostliny jsou schopny kontaminanty absorbovat a transformovat, čímž mohou ovlivňovat jejich vývoj a fyziologické procesy (Bártíková et al., 2016).

Albendazol (ABZ), patřící mezi benzimidazolová antihelmintika, je jedno z nejpoužívanějších léčiv k terapii infekčních onemocnění způsobených parazitickými červy (helminty) v chovech hospodářských zvířat. Mateřské látky spolu s metabolity jsou vylučovány z ošetřených zvířat do životního prostředí. O stabilitě ABZ v trusu nalezneme velmi málo informací, nicméně benzimidazoly jsou poměrně stabilní sloučeniny a je pravděpodobné, že si po dlouhou dobu dokážou zachovat svou strukturu. Kromě pastvin byl ABZ detekován v relativně vysoké koncentraci i v odpadních vodách. Můžeme jej tedy zařadit k důležitým mikrokontaminantům životního prostředí s vlivem na různé organismy (Stuchlíková et al., 2020).

V naší práci jsme se zabývali studiem antioxidantních enzymů a rostlinných pigmentů jetele lučního (*Trifolium pratense*), který byl ovlivněn ABZ ve zcela přirozených podmínkách na experimentálním poli. Tato vytrvalá pícnina se volně vyskytuje hlavně na pastvinách, kde se může dostat do styku s anthelmintiky z léčených zvířat. Tímto mohou být u rostlin způsobeny stresové podmínky, ve kterých může docházet ke vzniku oxidačního stresu. Rostliny si však vybudovaly ochranné enzymatické a neenzymatické antioxidantní systémy, které jsou schopny ROS eliminovat a zachytávat, čímž snižují pravděpodobnost poškození. Cílem této práce bylo zjistit vliv anthelmintika ABZ na vybrané antioxidantní enzymy a rostlinné pigmenty.

I přesto, že anthelmintika patří mezi důležité kontaminanty životního prostředí, mnoho studií zabývajících se fytotoxicitou těchto léčiv nenalezneme (Bártíková et al., 2016). Studie a práce zabývající se antioxidantními systémy rostlin (enzymatický, neenzymatický) nebo jejich pigmenty se většinou zaměřují na antibiotika a jiná léčiva. Dále je hojně studováno působení abiotických stresových faktorů jako jsou například

salinita, světlo, tma, těžké kovy, vlhkost, sucho nebo nedostatek živin (Graňáková, 2019).

Jetel luční byl pěstován na poli na jaře roku 2019, kdy bylo pro ovlivnění rostlin použito 35 g trusu o obsahu 14 μg ABZ nebo 105 g trusu o obsahu 42 μg ABZ. Na jaře 2020 byla studie zopakována, ale pouze se 105 g trusu o obsahu 42 μg ABZ. Rostliny jetele byly sklizeny po 3 měsících od ovlivnění. Kromě ovlivněných rostlin byly za stejných podmínek pěstovány i rostliny kontrolní, bez přítomnosti ABZ. Specifická aktivita byla stanovená u enzymů APX, CAT, SOD, GST, POX, GR a GPX pomocí různých metod v subcelulárních frakcích. K přípravě subcelulárních frakcí byly použity listy jetele.

U všech vzorků byla také změřena a vypočítána koncentrace bílkovin. Pokles koncentrace bílkovin byl pozorován u vzorků ovlivněných 35 g trusu s obsahem 14 μg ABZ, nicméně nebyl významný. Signifikantní pokles nastal až u vzorků ovlivněných 105 g trusu s 42 μg ABZ, a to v obou letech. Lze tedy říct, že ABZ mohl mít vliv na koncentraci bílkovin v rostlinách jetele lučního.

Studii, která se nejvíce blíží naší práci, vypracovala Graňáková, (2019) na sóje luštinaté (*Glycine max*). Rostliny sóji pěstované ve skleníku byly ovlivněny anthelmintiky ivermektinem (IVM) a fenbendazolem (FBZ). Byla měřena specifická aktivita APX, CAT, SOD, GST, POX, GR a GPX v semínkách, kořenech, listech a luscích sóji. Dle dosažených výsledků bylo zjevné, že obě anthelmintika ovlivnila antioxidační enzymy sóji, což může vést k poškození jejích antioxidačních systémů.

Vliv dvou anthelmintik, flubendazolu (FLU) a FBZ, na specifické aktivity CAT, APX, POX, SOD a GST byl sledován v listech jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*) pěstovaného za sterilních podmínek (Stuchlíková et al., 2018). Jitrocel obě anthelmintika z kultivačního média absorboval a transportoval do nadzemních částí rostliny. FLU a FBZ v listech jitrocele způsobily oxidační stres a snížily antioxidační ochranu rostliny.

Ovlivnění specifické aktivity benzimidazolovými anthelmintiky bylo shodné u enzymu GST. Jak v listech sóji, tak v listech jetele nastal signifikantní nárůst aktivity oproti kontrolním vzorkům. U jetele nastal nárůst pouze u rostlin ovlivněných 105 g trusu s obsahem 42 μg ABZ. U jitrocele se aktivita GST zvýšila pouze při ovlivnění FBZ, při ovlivnění FLU aktivita naopak poklesla.

V této práci byla aktivita CAT u jetele stanovená dvěma způsoby: pomocí reakce molybdenanu amonného, kdy došlo ke snížení aktivity u rostlin hnojených

35 g i 105 g trusu s ABZ a pomocí reakce peroxidu vodíku, kdy došlo k zvýšení aktivity u rostlin ovlivněných 105 g trusu, a to v roce 2020. Rozdíl aktivit u jednotlivých způsobů stanovení může být dán rozdílnými metodami měření. U stanovení pomocí reakce peroxidu vodíku byl měřen lineární pokles absorbance v UV destičkách, zatímco v reakci s molybdenanem amonným byla měřena absorbance vzniklého žlutého komplexu. Při měření CAT v reakci s peroxidem vodíku nebyl pokles vždy lineární. Tímto mohly být zapříčiněny rozdíly v aktivitách u stejného enzymu. Specifická aktivita CAT se zvýšila také u jitrocele po ovlivnění FLU.

Specifická aktivita SOD byla u rostlin jetele významně snížena v obou letech, nicméně pouze u rostlin ovlivněných 105 g trusu se 42 μg ABZ. U sóji byl zaznamenán pokles aktivity při ovlivnění rostliny FBZ. Specifická aktivita byla také snížena u rostlin jitrocele jak v přítomnosti FLU, tak FBZ.

Aktivita POX byla u jetele stejně jako CAT stanovena dvěma způsoby. K významnému snížení aktivity POX stanovené pomocí reakce s guajakolem došlo v obou letech, ale pouze u rostlin ovlivněných 105 g trusu s ABZ. Specifická aktivita POX stanovená reakcí s pyrokatecholem u rostlin jetele byla také snížena, ale pouze u jetele ročníku 2020. U sóji byla specifická aktivita POX stanovena pomocí reakce s pyrokatecholem, kdy došlo ke zvýšení aktivity v listech rostlin ovlivněných FBZ. Aktivita POX u jitrocele byla zvýšena při aplikaci FLU, a naopak snížena při aplikaci FBZ.

Aktivita APX byla u jetele z roku 2019 významně zvýšená, ale pouze u vzorků ovlivněných 105 g trusu se 42 μg ABZ. Snížení aktivity nastalo v roce 2020. U listů sóji nedošlo k žádné významné změně aktivity, stejně tak jako u jitrocele.

GR a GPX nebylo možné stanovit u obou ročníků jetele z důvodu nelineárního poklesu absorbance v rostlinných subcelulárních frakcích. V sóji v listech a semenech nastal obdobný problém, specifická aktivita byla naměřena u GPX pouze v lusku a kořeni.

Při porovnání jednotlivých enzymů mezi studii na jeteli, sóje a jitroceli musíme brát v úvahu podmínky pěstování rostlin a způsob ovlivnění anthelmintiky. Sója byla pěstována ve skleníku, jitrocel byl pěstován sterilně v *in vitro* podmínkách, zatímco jetel byl vystaven kromě působení ABZ i různým abiotickým stresorům z vnějšího prostředí, protože jeho pěstování proběhlo na experimentálním poli. Aplikace anthelmintik byla též rozdílná. Zatímco sója byla zalévána roztokem anthelmintik, jitrocel byl pěstován v kultivačním médiu s přísadkou anthelmintik, k jetelu byl

aplikován pouze ovčí trus s obsahem ABZ. Rozdíly mohou být dané i mezidruhovou odlišností rostlin a různými druhy použitých anthelmintik. I přesto nemůžeme vliv anthelmintika ABZ jako stresoru na antioxidační systémy jetele lučního zcela vyloučit, vzhledem k poklesům či nárůstům specifické aktivity.

Při meziročním porovnání kontrolních vzorků byly detekovány signifikantní rozdíly specifických aktivit u jednotlivých enzymů. U enzymu CAT stanoveného pomocí molybdenanu amonného, APX a GST došlo ke zvýšení specifické aktivity u vzorků z roku 2020 oproti vzorkům z roku 2019. Naopak ke snížení specifické aktivity došlo u vzorků CAT stanovené pomocí peroxidu vodíku, SOD, POX stanovené pomocí pyrokatecholu i guajakolu. Pouze u stanovení specifické aktivity pomocí guajakolu nebyla změna signifikantní. Rozdílné meziroční aktivity jednotlivých enzymů mohly být dány abiotickými stresory vnějšího prostředí jako jsou vlhkost, sluneční svit, teplota a podobně.

U rostlinných pigmentů jsme se zaměřili na stanovení koncentrací chlorofylů a karotenoidů v rostlinách jetele. Extrakty byly připraveny z listů rostlin vypěstovaných v roce 2020. Pro měření absorbance extraktů byla využita spektrofotometrie. Pro výpočet koncentrace pigmentů chlorofylu *a*, *b*, jejich poměru *a/b* a karotenoidů byly využity Lichtenthalerovy rovnice (Lichtenthaler et al., 1987)

Ve studii Opris et al., (2020) byla pro ovlivnění využita tři nesteroidní protizánětlivá farmaka (diklofenak, ibuprofen a naproxen). Zmíněnými léčivy byly stresovány tři druhy rostlin, a to lebeda rozkladitá (*Atriplex patula*), špenát zelený (*Spinacia oleracea*) a locika setá (*Lactuca sativa*). Všechny rostliny byly zalévány roztoky připravenými z vybraných léčiv, studie probíhala *in vitro*. Expozice všech tří léčiv vedla ke snížení chlorofylů *a*, *b*, *a/b* a karotenoidů. Ošetřené listy rostlin vykazovaly poškození chloroplastů a buněčných stěn. Podobných výsledků bylo dosaženo v práci Taibi et al., (2016). Studovanou rostlinou byl fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*). Rostlina byla stresována roztokem chloridu sodného (NaCl). Vlivem salinity u všech rostlin došlo ke snížení jak celkových chlorofylů, tak karotenoidů. Rostliny byly vypěstovány ve skleníku.

Nováková, (2020) v práci využívá tři anthelmintika ABZ, IVM a monepantel (MOP). Jako studované rostliny byly použity jetel luční a vojtěška setá (*Medicago sativa*). Rostliny byly vypěstovány a ovlivněny roztoky anthelmintik ve skleníku. Na rostlinách jetele bylo pozorováno snížení koncentrace karotenoidů při aplikaci ABZ

a IVM. Při aplikaci MOP nebyla pozorována změna. U jetele nebyla pozorována žádná změna koncentrace chlorofylů po ovlivnění všemi zmíněnými anthelmintiky.

U rostlin ovlivněných ABZ v naší práci nedošlo k signifikantním změnám v koncentracích chlorofylů *a*, *b*, ani jejich poměru *a/b*. Významně vzrostly pouze koncentrace celkových karotenoidů, které podle Verma a Mishra, (2005) řadíme mezi antioxidanty schopné detoxikovat ROS u rostlin. Vzrůst koncentrace karotenoidů je pozorován při vystavení rostlin toxickým látkám, pravděpodobně to souvisí s ochranou proti ROS (Nováková, 2020), nicméně podle studie Munné-Bosch a Alegre, (2000) karotenoidy naopak klesají při velmi silném stresu v důsledku destrukce ROS.

Chlorofyly jsou pro rostlinu důležitým fotosyntetickým pigmentem, který určuje fotosyntetickou kapacitu, nicméně pomocí koncentrace chlorofylů lze i posoudit kumulativní dopad environmentálního stresu na rostliny (Mlodzinska, 2009). Významná změna koncentrace chlorofylů po ovlivnění ABZ oproti kontrolním vzorkům jetele lučního nebyla v naší práci zaznamenána.

Při hodnocení koncentrace rostlinných pigmentů musíme vzít v úvahu, že rostliny jetele byly vypěstovány ve zcela přirozených podmínkách na experimentálním poli. Mohly být kromě ABZ ovlivněny různými abiotickými stresory nebo biotickými z vnějšího prostředí.

Studie antioxidantních enzymů a rostlinných pigmentů u jetele lučního měla natolik specifické podmínky, postupy a cíle, čímž se stala obtížně srovnatelnou s jinými výzkumy. Jelikož se každá studie zabývá jinými rostlinami, případně stejnými rostlinami, které jsou ale pěstovány v jiných podmínkách, je velmi obtížné jejich vzájemné porovnání. V úvahu musíme vzít i použití různých stresorů působících na rostliny. V jednotlivých studiích se autoři hojně zaměřují na abiotické stresory, antibiotika, různá humánní léčiva s minimálním množstvím prací zaměřených na léčiva veterinární, a to přímo anthelmintika.

Práce může být prospěšná pro různé výzkumy zabývající se environmentálním vlivem anthelmintik, a to konkrétně albendazolu, u kterého bylo prokázáno, že dokáže působit na životní prostředí a ovlivňovat necílové organismy.

7. ZÁVĚR

V této diplomové práci byl sledován vliv často užívaného anthelmintika ABZ na aktivitu vybraných rostlinných antioxidantních enzymů a koncentraci vybraných rostlinných pigmentů u jetele lučního (*Trifolium pratense*).

- Jetel luční byl ovlivněn 35 g nebo 105 g ovčím trusů s obsahem ABZ (35 g s obsahem 14 µg ABZ, 105 g s obsahem 42 µg ABZ). Experiment proběhl ve zcela přirozených podmínkách na experimentálním poli.
- Rostliny byly rozděleny na jednotlivé skupiny, dle množství aplikovaného trusu. Jako biologický materiál pro vytvoření subcelulárních frakcí a extraktů byly použity listy jetele lučního.
- Metodou podle Bradfordové byla stanovena koncentrace bílkovin v jednotlivých skupinách rostlin. Koncentrace bílkovin byla dále použita při výpočtu specifické aktivity enzymů.
- Proběhlo stanovení aktivity sedmi antioxidantních enzymů CAT, SOD, APX, POX, GPX, GR, GST. U GR a GPX nebyla naměřena žádná aktivita. U zbylých enzymů bylo pozorováno statisticky významné nebo nevýznamné zvýšení či snížení specifické aktivity oproti kontrolám. Specifické aktivity jednotlivých enzymů byly porovnány i u kontrolních vzorků z obou let (2019-2020).
- Byla stanovena koncentrace chlorofylů *a*, *b*, jejich poměr *a/b* a koncentrace karotenoidů. Signifikantní změna koncentrace byla pozorována pouze u karotenoidů.
- Veškeré výsledky specifických aktivit a výsledky koncentrací rostlinných pigmentů byly zpracovány statistickým programem GraphPad Prism 9.0.2 (nepárový t-test s Welchovou korekcí).

8. SEZNAM ZKRATEK

ABZ	albendazol
ABZSO	albendazol sulfoxid
ABZSO ₂	albendazol sulfon
APX	askorbátperoxidáza
AsA	kyselina askorbová
AsA-GSH	askorbát-glutathionový cyklus
BSA	bovinní sérový albumin
CAT	kataláza
CBBG	Coomassie Brilliant Blue G-250
CDNB	1-chlor-2,4-dinitrobenzen
Chl <i>a</i>	chlorofyl <i>a</i>
Chl <i>b</i>	chlorofyl <i>b</i>
Chl <i>a/b</i>	poměr chlorofylů <i>a/b</i>
ddH ₂ O	redestilovaná voda
DHA	monodehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbátreduktáza
DTT	dichlordifenyltrichloretan
EDTA	kyselina etylendiaminotetraoctová
EWS	pracovní roztok enzymů (<i>Enzyme Working Solution</i>)
FBZ	flubendazol
FLU	fenbendazol
GPX	glutathionperoxidáza

GOPX	guajakolperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
GST	glutathion-S-transferáza
IVM	ivermektin
MHDAR	monodehydroaskorbátreduktáza
MOP	monepantel
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
PBS	fosfátový pufr (<i>phosphate buffered saline</i>)
POX	peroxidáza
PVP	polyvinylpyrolidon
ROS	reaktivní druhy kyslíku
RX	xenobiotický substrát
SOD	superoxiddismutáza
WST	tetrazoliová sůl rozpustná ve vodě (<i>water-soluble tetrazolium salt</i>)

9. POUŽITÁ LITERATURA

AHMAD, P., C.A. JALEEL, M.A. SALEM, G. NABI a S. SHARMA. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010, 30(3), 161-175.

AHMAD, P., M. SARWAT a S. SHARMA. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 2008, 51(3), 167-173.

ALBORESI, A., L. DALL'OSTO, A. APRILE, P. CARILLO, E. RONCAGLIA, L. CATTIVELLI a R. BASSI. Reactive oxygen species and transcript analysis upon excess light treatment in wild-type *Arabidopsis thaliana* vs a photosensitive mutant lacking zeaxanthin and lutein. *BMC Plant Biology*. 2011, 11(1), 62.

ANJUM, N.A., P. SHARMA a S.S. GILL et al. Catalase and ascorbate peroxidase representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016, 23, 19002-19029.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*. 1992.

BÁRTÍKOVÁ, H., R. PODLIPNÁ a L. SKÁLOVÁ. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*. 2016, (144), 2290-2301.

BLOOM A. K., RYAN E.T. Albendazole. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease* 2013, 1088-1089.

BORGERAAS, J. a D.O. HESSEN. Diurnal patterns of antioxidant activity in alpine and arctic *Daphnia* under in situ UV-radiation. *Archiv fur Hydrobiologie*. 2002, 156(1), 83-95.

BOXALL, A. B. A. (2004). The environmental side effects of medication. *EMBO Reports*, 5(12), 1110–1116.

BOXALL, A. B. A., FOGG, L. A., BLACKWELL, P. A., BLACKWELL, P., KAY, P., PEMBERTON, E. J., & CROXFORD, A. (2004). *Veterinary Medicines in the Environment* (pp. 1–91). Springer, New York, NY.

BOXALL, A.B.A., C.J. SINCLAIR, K. FENNER, D. KOLPIN a S.J. MAUND. What are the absolute fate, effects, and potential risks to humans and the ecosystem? *When SYNTHETIC Chemicals Degrade in the Environment*. 2004.

BOXALL, A. B. A., JOHNSON, P., SMITH, E. J., SINCLAIR, C. J., STUTT, E., & LEVY, L. S. (2006). Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2288–2297.

BOXALL, A.B.A. a C. LONG. Veterinary medicines and the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009, 24(4), 759-760.

BURTON, G.W. a K.U. INGOLD. Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 1984, 4649(224), 569-573.

CARLBERG, I. a B. MANNERVIK. [59] Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*. 1985, 113, 484-490.

Carotene. *Shutterstock* [online]. New York, 2021 [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://www.shutterstock.com/cs/search/carotene>.

CHEN, S., Z. VAGHCHHIPAWALA, W. LI, H. ASARD a M.B. DICKMAN. Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants. *Plant Physiol*. 2004, 135(3), 1630-41.

COLEMAN, J., M BLAKE-KALFF a E. DAVIES. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Biochemical Sciences*. 1997, 2(4), 144-151.

COOKE, A.S., E.R. MORGAN a J.A.J. DUNGAIT. Modelling the impact of targeted anthelmintic treatment of cattle on dung fauna. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017, 55, 94-98.

CROFT, H. a J.M. CHEN. Leaf Pigment Content. *Comprehensive Remote Sensing*. Toronto: Elsevier, 2018, s. 117-142. ISBN 9780128032213.

DAS, K. a A. ROYCHOUDHURY. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*. 2014, 2, 53.

DAT, J., S.V. DENABEELE, E. VRÁNOVÁ, M. VAN MONTAGU, D. INZÉ a F.V. BREUSEGEM. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2000, 57, 779-795.

DAYAN, A.D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*. 2003, 86(2-3), 141-159.

DEL RÍO, L.A., L.M. SANDALIO, J.M. PALMA, M. GÓMEZ a J.B. BARROSO. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*. 2002, 53(372), 1255-1272.

DEYL, M. a K. HÍSEK. *Naše květiny*. 1. Academia, 2004, 724 s. ISBN 978-80-200-0940-1.

DI BACCIO, D., F. PIETRINI, P. BERTOLOTTI, S. PÉREZ, D. BARCELÒ, M. ZACCHINI a E. DONATI. Response of *Lemna gibba* L. to high and environmentally relevant concentrations of ibuprofen: Removal, metabolism and morpho-physiological traits for biomonitoring of emerging contaminants. *SCIENCE OF THE TOTAL environment*. 2017, 385, 363-373.

DROTAR, A., P. PHELPS a R. FALL. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science*. 1985, 42(1), 35-40.

DUCHÁČEK, L., & LAMKA, J. (2008). *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. 4. vyd. Praha: Karolinum, 152s. ISBN 9788024627908.

DUCHÁČEK, L., & LAMKA, J. (2014). *Veterinární vademecum pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 128s. ISBN 9788024627922

ESTÉVEZ, I.H. a M.R. HERNÁNDEZ. Plant Glutathione S-transferases: An overview. *Plant Gene*. 2020, 23.

GAO, F., J. CHEN, T. MA, H. LI, N. WANG, Z. LI, Z. ZHANG a Y. ZHOU. *The Glutathione Peroxidase Gene Family in Thellungiella salsuginea: Genome-Wide Identification, Classification, and Gene and Protein Expression Analysis under Stress Conditions*. 2014, 15(2), 3319-3335.

GHOLIZADEH, H., S.M. ROBESON a A.F. RAHMAN. Comparing the performance of multispectral vegetation indices and machine-learning algorithms for remote estimation of chlorophyll content: a case study in the Sundarbans mangrove forest. *International Journal of Remote Sensing*. 2015, 36(12), 3114-3133.

GILL, S.S. a N. TUTEJA. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010, 48(12), 909-930.

GILL, S.S., N.A. ANJUM, M. HASANUZZAMAN, R. GILL, D.K. TRIVEDI, I. AHMAD a N. TUTEJA. *Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations*. 2013, 204-212.

GILL, S.S., N.A. ANJUM, R. GILL, M. FUJITA, P. MISHRA, S.C. SABAT a N. TUTEJA. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015, 22, 10375-10394.

GLOSER, J. *Fyziologie rostlin*. Brno, 2012. Skripta. Masarykova univerzita.

GÓTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*. 1991, 196(2-3), 143-151.

GRAŇÁKOVÁ, P. *Modulácia expresie a aktivity vybraných detoxikačných enzýmů rastlín anthelmintikami*. Hradec Králové, 20219. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Szotáková, Barbora.

GUIDI, L., E.L. PICCOLO a M. LANDI. Chlorophyll Fluorescence, Photoinhibition and Abiotic Stress: Does it Make Any Difference the Fact to Be a C3 or C4 Species? *Frontiers in Plant Science*. 2019, 10, 174.

HANDY, D.E., E. LUBOS, Y. YANG, J.D. GALBRAITH, N. KELLY, Y. ZHANG, J.A. LEOPOLD a J. LOSCALZO. Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284(18), 11913–11921.

HAVAUX, M., R. BASSI a L. DALL'OSTO. Zeaxanthin Has Enhanced Antioxidant Capacity with Respect to All Other Xanthophylls in Arabidopsis Leaves and Functions Independent of Binding to PSII Antennae. *Plant Physiology*. 2008, 145(4), 1506-1520.

HEJDUK, S. *Jetel luční Rostlina, která změnila evropské zemědělství*. *Vesmír*. 2012.

HOPKINS, W.G. a HÜNER. *Introduction to Plant Physiology, 4th Edition*. 2008, 528 s. ISBN 978-0-470-24766-2.

HORVAT, A.J.M., S. BABIĆ, D. M. PAVLOVIĆ, D. AŠPERGER, S. PELKO, M. KAŠTELAN-MACAN, M. PETROVIĆ a A. D. MANCE. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012.

HRONEŠ, M. Trifolium pratense-jetel luční. *Natura Bohemica* [online]. -: -, 2008, 30. 6. 2008 [cit. 2021-4-7]. Dostupné z: <http://www.naturabohemica.cz/trifolium-pratense/>

HUSEYNOVA, I.M. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2012, 1817(8), 1516-1523.

IHLER, C.F. Anthelmintic resistance. An overview of the situation in the Nordic countries. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2008, 52.

Jetel luční-Trifolium pratense-SalviaParadiseShop. SalviaParadise Shop-Léčivé byliny, kapsle, masti, extrakty, semena a živé rostliny. [online]. Copyright © 2019 [cit. 01.04.2021]. Dostupné z: https://www.salviaparadise.cz/herbar-rostlin-jetel-lucni-trifolium-pratense-c-736_1118.html

JONES, Clive G., J. Daniel HARE a Steve J. COMPTON. Measuring plant protein with the Bradford assay. *Journal of Chemical Ecology*. 1989, 15, 979–992.

KAPLAN, R.M. a A.M. VIDYASHANKAR. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*. 2012, 186(1-2), 70-78.

KUBÁT, K. *Botanika*. 2. vyd. Praha: Scientia, pedagogické nakladatelství, 2003. ISBN 80-718-3266-9.

Kytky. In: *Středisko LIŠÁK Neratovice* [online]. 2019 [cit. 2021-04-19]. Dostupné z: <https://skaut-lisak.cz/skautska-praxe/2019/04/kytky/>.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 1987, (148), 350-382.

MADDISON, J., S. PAGE a D. CHURCH. *Small Animal Clinical Pharmacology*. 2. Saunders, 2008, 584 s. ISBN 9780702028588

MAKAWY, A.E., I. GHALY, H.A. RADWAN a A.A. EL-RAOUF. *Genotoxic, teratological and biochemical effects of anthelmintic drug oxfendazole Maximum Residue Limit (MRL) in male and female mice*. Reproduction Nutrition Development, 2006.

MARRS, K.A. THE FUNCTIONS AND REGULATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1996, 47, 127-158.

MCKELLAR, Q.A. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*. 1998, 72(3-4), 413-435.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Biochemical Sciences*. 2002, 7(9), 405-410.

MITTOVA, V., F.L. THEODOULOU, G. KIDDLE, L. GÓMEZ, M. VOLOKITA, M. TAL, C.H. FOYER a M. GUY. Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. *FEBS Letters*. 2003, 554(3), 417-421.

MLODZIŃSKA, E. Survey of plant pigments: molecular and environmental determinants of plant colors. *Acta biologica cracovienska Series Botanica*. 2009, 51(7), 10.

MOLAEI RAD, A., H. GHOURCHIAN, A.A. MOOSAVI-MOVAHEDI, J. HONG a K. NAZARI. Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol–aniline coupling hydrogen donor. *Analytical Biochemistry*. 2007, 362(1), 38-43.

MOLLEROVÁ, J. Symbiotická fixace dusíku. Bakterie Rhizobium s. l. a Frankia / Symbiotic Fixation of Nitrogen. Rhizobium s. l. and Frankia. *Živa*. 2006, 9.

MUNNÉ-BOSCH, S. a L. ALEGRE. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*. 2000, 210, 925-931.

NAKANO, Y. a K. ASADA. Purification of Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts; Its Inactivation in Ascorbate-Depleted Medium and Reactivation by Monodehydroascorbate Radical. *Plant and Cell Physiology*. 1987, 28(1), 131–140.

NOVÁKOVÁ, A. Účinky a metabolismus anthelmintik v pícech. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Skálová, Lenka.

OPLETALOVÁ, V. Anthelmintika. In Farmaceutická chemie IV. 1.vydání Praha: Karolinum, 2006. kapitola 1.7, 156-164, ISBN 978-80-246-1169-3.

OPRIŞ, O., I. LUNG, A. CIORÎŢĂ a L. COPOLOVICI. Investigating the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the composition and ultrastructure of green leafy vegetables with important nutritional values. *SCIENCE OF THE TOTAL environment*. 2020, 151, 342-351.

PAN, X., M. LI, T. WAN, et al. Structural insights into energy regulation of light-harvesting complex CP29 from spinach. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2011, 18, 309-315.

PANDEY, P., J. SINGH, V.M.M. ACHARY a M.K. REDDY. Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway. *Frontiers in Environmental Science*. 2015, 3, 25.

PAREEK, S., N.A. SAGAR, S. SHARMA, V. KUMAR, G.A.G. AGUILAR a E.M. YAHIA. Chlorophylls: Chemistry and Biological Functions. *Phytochemicals of Fruits and Vegetables*. 2017.

- PASCAL, S. a R. SCALLA. Purification and characterization of a safener-induced glutathione S-transferase from wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum*. 1999, 106(1), 17-27.
- PÉREZ-LÓPEZ, U., A. ROBREDO, M. LACUESTA, C. SGHERRI, A. MUÑOZ-RUEDA, F. NAVARI-IZZO a A MENA-PETITE. The oxidative stress caused by salinity in two barley cultivars is mitigated by elevated CO₂. *Physiologia Plantarum*. 2009, 135(1), 29-42.
- PODLIPNÁ, R., L. SKÁLOVÁ, H. SEIDLOVÁ, B. SZOTÁKOVÁ, L. STUHLÍKOVÁ, R. JIRÁSKO, T. VANĚK a I. VOKŘÁL. Biotransformation of benzimidazole anthelmintics in reed (*Phragmites australis*) as a potential tool for their detoxification in environment. *Bioresource Technology*. 2013, 144, 216-224.
- POPOVA, A.V. SPECTRAL CHARACTERISTICS AND SOLUBILITY OF beta-CAROTENE AND ZEAXANTHIN IN DIFFERENT SOLVENTS. *Bulgarian Academy of Sciences*. 2017, 70(1), 55-62.
- RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., L. SKÁLOVÁ, B. SZOTÁKOVÁ, E. SYSLOVÁ, I. VOKŘÁL, T. VANĚK a R. PODLIPNÁ. Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018, 147, 681-687.
- RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., M. NAVRÁTILOVÁ, L. LANGSHANSOVÁ, K. MOŤKOVÁ, R. PODLIPNÁ, B. SZOTÁKOVÁ a L. SKÁLOVÁ. The Identification of Metabolites and Effects of Albendazole in Alfalfa (*Medicago sativa*). *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(16).
- REN, R., Z. LI, L. ZHANG, H. ZHOU, X. JIANG a Y. LIU. Enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems impact the viability of cryopreserved *Paeonia suffruticosa* pollen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) volume*. 2020, 144, 233-246.
- RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010, 504(1), 118-122.
- RUIFFEN, R., Z. LI, L. ZHANG, H. ZHOU, X. JIANG a Y. LIU. Enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems impact the viability of cryopreserved *Paeonia suffruticosa* pollen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2021, 144(1), 233–246.
- SAED-MOUCHESHI, A., A. SHEKOOFA a M. PASSARAKLI. Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Detoxifying in Plants. *Journal of Plant Nutrition*. 2011, 37(10), 1573-1585.
- SANDERMANN JR., H. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences*. 1992, 17(2), 82-84.
- SANGSTER, N.C. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology*. 1999, 29(1), 115-124.
- SEKMEN, A.H., S. ESEN, R. OZGUR a B. UZILDAY. The response of the xerophytic plant *Gypsophila aucheri* to salt and drought stresses: The role of the antioxidant defence system. *Turkish Journal of Botany*. 2012, 36(6), 697-706.

SCHAFFNER, A., B. MESSNER a h. SANDERMANN. Genes and Enzymes for In-Planta Phytoremediation of Air, Water and Soil. *Acta Biotechnologica*. 2002, 22(1-2).

SOD Protocol. (n.d.). Dostupné z: https://www.dojindo.eu.com/Protocol/SOD_Oxidative_Stress.pdf [cit. 2021-03-06].

STUHLÍKOVÁ, L., R. JIRÁSKO, L. SKÁLOVÁ, F. PAVLÍK, B. SZOTÁKOVÁ, M. HOLČAPEK, T. VANĚK a R. PODLIPNÁ. Metabolic pathways of benzimidazole anthelmintics in harebell (*Campanula rotundifolia*). *Chemosphere*. 2016, 157, 10-17.

STUHLÍKOVÁ, L.R., L. SKÁLOVÁ, B. SZOTÁKOVÁ, I. VOKŘÁL, T. VANĚK a R. PODLIPNÁ. Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018, 147, 681-687.

TAĪBI, K., F. TAĪBI, L.A. ABDERRAHIM, A. ENNAJAH, M. BELKHODJA a J.M. MULET. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*. 2016, 105, 306-312.

TAKAHASHI, H., Z. CHEN, H. DU, Y. LIU a D.F. KLESSSIG. Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants severely reduced catalase levels. *The Plant Journal*. 2002, 993-1005.

VANĚK, T., P. SOUDEK, R. PODLIPNÁ, Š. PETROVÁ a P. LANDA. *Fytoremediace a možnosti její aplikace*. Praha: Středisko společných činností AV ČR, 2017. Věda kolem nás. ISBN 978-802-7022-489.

VASEVA, I., Y. AKISCAN, L. SIMOVA-STOILLOVA, R. NENKOVA, I. ANDERS, U. FELLER a K. Antioxidant response to drought in red and white clover. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2012, 34, 1689-1699.

VERMA, S. a R.S. DUBEY. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Department of Biochemistry*. 2003, 164(4), 645-655.

VERMA, S. a S.N. MISHRA. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *Journal of Plant Physiology*. 2005, 162(6), 669-677.

VICUNA, D. *The Role of Peroxidases in the Development of Plants and Their Responses to Abiotic Stresses*. DUBLIN, 2005. Doctoral thesis. Technological University Dublin.

VOLF, P. a P. HORÁK. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007, 320 s. ISBN 978-807-3870-089.

WILLEKENS, H., S. CHAMNONGPOL, M. DAVEY, M. SCHRAUDNER, C. LANGEBARTELS, M.V. MONTAGU, D. INZÉ a W.V. CAMP. Catalase is a sink for

H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J.* 1997, **16**(16), 4806–4816.

YE, L. a Y. ZHANG. Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*. 1987, **22**(12), 1987–1992.

Zeaxanthin. *Shutterstock* [online]. New York, 2021 [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://www.shutterstock.com/cs/search/zeaxanthin>

ZEMEK, F., M. PIVVARNÍK, P. HESSLEROVÁ, et al. *Letecký dálkový průzkum Země: teorie a příklady hodnocení terestrických ekosystémů*. Brno: Centrum výzkumu globální změny AV ČR, 2014, 155 s. ISBN 978-80-87902-07-3.